

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Magi Lukač
685/USH

**UTJECAJ DODATKA LIMUNSKÉ
KISELINE NA FUNKCIONALNA
SVOJSTVA TEKUĆIH
PASTERIZIRANIH JAJA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju mesa i ribe na Zavodu za prehrambeno- tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Helge Medić te uz pomoć dr. sc. Nives Marušić Radovčić.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Laboratorija za tehnologiju mesa i ribe na pruženoj pomoći
i danim savjetima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno - tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju mesa i ribe

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UTJECAJ DODATKA LIMUNSKKE KISELINE NA FUNKCIONALNA SVOJSTVA TEKUĆIH PASTERIZIRANIH JAJA

Magi Lukač 685/USH

Sažetak: *Jaja i proizvodi od jaja imaju važnu i nezamjenjivu ulogu u ljudskoj prehrani zbog visokovrijednih sastojaka i široke primjene. Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj dodatka limunske kiseline na funkcionalna svojstva tekućih pasteriziranih jaja tijekom 4 tjedna skladištenja. U tekuća jaja dodane su 3 različite koncentracije limunske kiseline (0, 300, 400 i 500 mg L⁻¹). Ispitivane su karakteristike poput topljivosti proteina, svojstava pjenjanja i emulgirajućih svojstava te ukupan broj bakterija. Iako se dodatkom 500 mg L⁻¹ limunske kiseline postiže najveća redukcija broja bakterija, funkcionalna svojstva se značajno narušavaju. Dodatkom 300 mg L⁻¹ limunske kiseline postiže se zadovoljavajuća redukcija broja bakterija, uz očuvanje funkcionalna svojstva.*

Ključne riječi: tekuće cijelo jaje, limunska kiselina, mikrobiologija, topljivost, pjenjenje, emulgiranje

Rad sadrži: 70 stranica, 21 sliku, 16 tablica, 73 literaturna navoda.

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format) pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *Prof. dr. sc. Helga Medić*

Pomoć pri izradi: *dr. sc. Nives Marušić Radovčić, viši asistent*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

- 1. Izv. prof. dr. sc. Anet Režek Jambrak*
- 2. Prof. dr. sc. Helga Medić*
- 3. Izv. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić*
- 4. Izv. prof. dr. sc. Damir Stanzer*

Datum obrane: 28.09.2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food Engineering
Laboratory for Meat and Fish Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

EFFECT OF CITRIC ACID ADDITION ON FUNCTIONAL PROPERTIES OF LIQUID PASTEURIZED EGGS

Magi Lukač 685/USH

Abstract: *Eggs and egg products have important and irreplaceable role in human nutrition because of valuable nutrients and a wide range of applications. The aim of this research was to examine influence of citric acid addition (0, 300, 400 and 500 mg L⁻¹) on functional properties of liquid pasteurised eggs during 4 weeks of storage. Functional properties evaluated were: protein solubility, foaming and emulsifying properties and total bacteria count. Although addition of 500 mg L⁻¹ citric acid gave the best bacteria reduction, functional properties were significantly changed. Addition of 300 mg L⁻¹ gave satisfactorily bacteria reduction without affecting functional properties.*

Keywords: liquid whole eggs, citric acid, microbiology, solubility, foaming, emulsifying.

Thesis contain: 70 pages, 21 figures, 16 tables, 73 references.

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version deposited in: Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Helga Medić, Full Professor*

Technical support and assistance: *PhD. Nives Marušić Radovčić, senior assistant*

Reviewers:

1. *PhD. Anet Režek Jambrak, Associate Professor*
2. *PhD. Helga Medić, Full Professor*
3. *PhD. Jasna Mrvčić, Associate Professor*
4. *PhD. Damir Stanzer, Associate Professor*

Thesis defended: 28.09.2016.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	3
2.1.	NUTRITIVINA VRIJEDNOST JAJA	4
2.1.1.	Proteini	6
2.1.2.	Lipidi.....	6
2.1.3.	Ugljikohidrati	6
2.1.4.	Vitamini	7
2.1.5.	Minerali.....	7
2.2.	PROIZVODI OD JAJA	8
2.2.1.	Tekuća jaja	8
2.3.	TEHNOLOŠKI PROCES PROIZVODNJE TEKUĆIH PASTERIZIRANIH JAJA	12
2.4.	ADITIVI U TEKUĆIM PASTERIZIRANIM JAJIMA	15
2.5.	MIKROBIOLOGIJA TEKUĆIH PASTERIZIRANIH JAJA.....	16
2.6.	FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE JAJA.....	17
2.6.1.	Topljivost proteina	18
2.6.2.	Pjenjenje.....	19
2.6.3.	Emulgiranje	21
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	22
3.1.	MATERIJAL	23
3.1.1.	Uzorci tekućih pasteriziranih jaja	23
3.2.	METODE.....	24
3.2.1.	Određivanje ukupnog broja mikroorganizama	24
3.2.2.	Određivanje topljivosti proteina	26
3.2.3.	Određivanje značajki pjenjenja.....	27
3.2.4.	Određivanje emulgirajućih svojstava	29
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	32
4.1.	ODREĐIVANJE UKUPNOG BROJA MIKROORGANIZAMA.....	34
4.3.	ODREĐIVANJE ZNAČAJKI PJENJENJA	39
4.4.	ODREĐIVANJE EMULGIRAJUĆIH SVOJTAVA	48
5.	ZAKLJUČCI.....	62
6.	LITERATURA	64

1. UVOD

Jaja zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti, niske tržišne cijene i široke dostupnosti čine idealnu namirnicu u ljudskoj prehrani. Obzirom da su bogata proteinima, lipidima, vitaminima (osim vitamina C) i mineralima postoje brojne nutritivne prednosti njihovog konzumiranja (EC, 2008). Iako je kroz dugi niz godina uz jaja vezan negativan publicitet, prvenstveno zbog udjela kolesterola, brojna istraživanja opovrgnula su direktnu povezanost konzumacije jaja s raznim bolestima (Herron i sur., 2003).

Užurbanošću, željom za jednostavnijom primjenom i mikrobiološki ispravnim proizvodom nastaju proizvodi od jaja. Razlikujemo tekuća, smrznuta i jaja u prahu. Zbog smanjenja skladišnog prostora i duže trajnosti, njihova primjena je sve veća.

Uslijed razvoja tehnologije postoje različite nove metode procesiranja ulazne sirovine – jaja u ljusci kako bi se u konačnici dobio bolji i stabilniji proizvod. Neke od tih novih metoda podrazumijevaju primjenu visokog hidrostatskog tlaka, mikrovalova, pakiranja u modificiranoj atmosferi i sl. Uz to, postoje brojni dodaci poput šećera, soli, kiselina kojima se pokušavaju dobiti određene karakteristike krajnjeg proizvoda. Pri tome je izuzetno važno paziti da funkcionalna svojstva (emulgiranje, pjenjenje, želiranje, topljivost proteina i sl.) proizvoda ostanu minimalno promijenjena (Stadelman i Cotterill, 1977; Lomakina i Mikova, 2006).

Limunska kiselina ($C_6H_8O_7$) je slaba organska kiselina i prirodni konzervans koji se često dodaje u tekuća pasterizirana jaja i očit je pad pH vrijednosti nakon njenog dodatka. Također, pokazalo se kako pomaže u očuvanju boje jaja, ne dopuštajući da ona poprime sivu ili zelenu boju (Kretzschmar – McCluskey, 2007).

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj dodatka različitih koncentracija limunske kiseline (0, 300, 400 i 500 mg L⁻¹) na funkcionalna svojstva tekućih pasteriziranih jaja tijekom 4 tjedna. Ispitivana je topljivost proteina, svojstva pjenjenja i emulgiranja te ukupan broj bakterija.

2. TEORIJSKI DIO

2.1.NUTRITIVINA VRIJEDNOST JAJA

Jaja su zbog svog visokog udjela proteina i drugih esencijalnih nutrijenata jako važna namirnica u ljudskoj prehrani već stoljećima. Konzumacija jaja u Europskoj uniji je u zadnjih 20 godina konstantno visoka te bilježi mali porast bez obzira na lošu reputaciju i negativne reportaže u medijima (Elmadfa, 2009). Negativni publicitet najviše se odnosi na to da su jaja izvor kolesterola te da postoji rizik od kontaminacije jaja patogenim mikroorganizmima i toksičnim ostacima.

Upravo zbog visoke koncentracije kolesterola, jaja su pozicionirana na sam vrh piramide pravilne prehrane koja pomaže u stjecanju percepcije raznolikosti namirnica te veličine porcija potrebnih za održavanje uravnotežene prehrane. Gledajući iz ove perspektive, jaja nisu namirnica koju se preporučuje često konzumirati. Bez obzira na mnoge eksperimente i epidemiološke studije, kolesterol u jajima (oko 250 mg po jajetu) i dalje predstavlja veliki problem za mnoge potrošače. Međutim, utvrđeno je kako isti nema značajan učinak na kolesterolemiju. Mnoge studije su pokazale kako dnevna konzumacija jednog do dva jajeta ne povećava razinu kolesterola u krvi ili rizik od kardiovaskularnih bolesti. Provedena su i istraživanja na ljudima s dijagnosticiranom hiperkolesteremijom, hipertrigliceridemijom i dijabetesom te je dokazano da nema povećanja koncentracije LDL kolesterola nakon konzumacije jaja (Herron i sur., 2003).

Nutritivna vrijednost hrane može se prikazati na nekoliko različitih načina. Najčešći i najuobičajeniji prikaz su količine različitih važnih nutrijenata u 100 grama ili u jednoj porciji namirnice. Ona ovisi o mnogim faktorima kao što su starost jaja, postupci prerade i metode kulinarske pripreme, ali i o vrsti preradi, pasmini i starosti kokoši nesilica (Kniewald, 1993).

Generalni problem kod ovakvog načina prikaza je velik broj različitih izvora i tablica za različite države Europske unije. One se mogu pronaći na web stranicama *European Food Information Resources od Excellence Network* (Anonymous, 2005). Unutar tih tablica mogu se vidjeti podaci za velik broj različitih nutrijenata koji su uzeti iz jedne Europske baze podataka koja je podržana od strane Ministarstva poljoprivrede SAD-a (USDA). Može se vidjeti kako pojedine komponente variraju od države do države što se može pripisati različitim analitičkim metodama određivanja ili kao normalan raspon vrijednosti u biološkom materijalu.

Pokušavajući poboljšati nutritivnu vrijednost jaja manipulira se udjelom pojedinih komponenti. Povećanje pojedine komponente je poprilično jednostavno i odnosi se na

modifikaciju ishrane nesilica. S druge strane, reduciranje, koje su uglavnom odnosi na smanjenje udjela kolesterola, je puno teže ili možda čak i nemoguće.

U pogledu nutritivne vrijednosti jedno kokošje jaje ekvivalent je 160 g mlijeka, 82,5 g goveđeg mesa ili 87,5 g telećeg mesa (Kniewald, 1993).

Kada se govori o nutritivnoj vrijednosti hrane, mora se uzeti u obzir bioiskoristivost. Riječ je o procesu koji može biti definiran na način da je to udio nekog nutrijenta koji je probavljen, apsorbiran i metaboliziran, odnosno udio nutrijenta koji je završio u krvotoku. Biodostupnost je važna zato što, na primjer, jaja sadrže visok udio željeza i kroz neko vrijeme se smatralo da su odličan izvor ovog minerala. Međutim, obzirom na njegovu interakciju s fosfitinom, biodostupnost je niska (Hallberg i Hulthen, 2000). S druge strane, iako jaja nisu toliko bogata zeaksantinom i luteinom, za razliku od mnogobrojnog povrća, njihova iskoristivost je jako visoka ako se unose konzumacijom jaja. Veliki je problem što je jako malo istraživanja koji se bavi ovom problematikom, a da im je fokus na jajima. Sve je više istraživanja koji se bave obogaćivanjem jaja različitim vitaminima i mineralima dok se bioiskoristivost istih još uvijek ne analizira (Chung i sur., 2004).

2.1.1. Proteini

Proteini u jajima su jako važni obzirom na prisutne esencijalne aminokiseline. Konzumacijom 100 g jaja može se unijeti značajna količina lizina te aminokiselina koje u svojoj strukturi sadrže sumpor (Nys i Sauveur, 2004). Mnoge biološke aktivnosti proteina jaja, poput antihipertenzivnih, antiupalnih i antioksidativnih značajki te poboljšanje u bioiskoristivosti pojedinih minerala pokazala su se kao nutritivna prednost konzumacije jaja (Rehault i sur., 2007).

2.1.2. Lipidi

Sadržaj lipida u žumanjku ne varira značajno, međutim sastav masnih kiselina ovisi u ishrani kokoši nesilica. Poznato je kako omega 6 masne kiseline mogu smanjiti udio kolesterola, a omega 3 masne kiseline mogu prevenirati kardiovaskularne bolesti. Postoje brojna istraživanja kojima se pokušalo utjecati na udio omega 6 i omega 3 masnih kiselina te manipulirati njihovim omjerom. Recimo, Lewis i sur. (2000) u svojem istraživanju uspjeli su povećati udio omega 3 masnih kiselina za osam puta, dok su Bean i Leeson (2003) uspjeli smanjiti omjer omega 6 i omega 3 na 1,8 ili 1,9. Iako je udio polinezasićenih masnih kiselina visok, postoji sve više studija u kojim se taj udio povećava modificiranjem ishrane. Također, sve je više istraživanja koja se bave obogaćivanjem jaja specijalnim nezasićenim masnim kiselinama, poput konjugirane linolenske kiselina (CLA) koja ima antikancerogena, antidijabetska, imunostimulirajuća i hipokolesterolemična svojstva (Pariza, 2004).

Danas je moguće proizvesti jaja s dvostruko više omega 3 masnih kiselina, 25% manje masti te povećati udio luteina (35%) (Davis i Reeves, 2002).

2.1.3. Ugljikohidrati

Jaja ne sadrže dijetalna vlakna i mala količina prisutnih ugljikohidrata (manja od 1%) nije značajna u ljudskoj prehrani.

2.1.4. Vitamini

Jaja su odličan izvor različitih vitamina. Konzumacijom jednog jajeta srednje veličine (oko 50 g) zadovoljava se 15% preporučenog dnevnog unosa vitamina A, D, K, B₁₂, folne kiseline i biotina. Ukoliko se konzumira 100 g jaja (ekvivalentno dva srednja jaja), vitamin E, B₂, niacin i pantotenska kiselina premašuju zadani postotak čime se može reći kako jaja sadrže značajan udio istih. Jaja su siromašna vitaminom C zato što tijekom razvoja embrija nema potrebe za njim (EC, 2008).

Mnogi znanstvenici su zaključili kako genetika, odnosno različite pasmine igraju veliku ulogu u vitaminskom sastavu jaja (Nemanič i Berić, 1995).

Kao što je i slučaj s masnim kiselinama, udio vitamina u jajima varira ovisno u ishrani nesilica, čime se može manipulirati udio pojedinog vitamina i utjecati na nutritivnu vrijednost. Postoje brojna istraživanja u kojim je opisan dodatak različitih vitamina poput vitamina E, vitamina D, folata i vitamina B₁₂. Brojni dodaci se koriste i danas u komercijalnoj prodaji (Mattila i sur., 2003; Bunchasak i Kachana, 2009; Jeroch i sur., 2002).

2.1.5. Minerali

Jaja su, također, jako dobar izvor minerala. Gledajući konzumaciju jednog jajeta srednje veličine, značajnu udio zadovoljavaju fosfor (16,4%) i selen (23,6%), dok konzumacijom dva jajeta značajni su željezo (15%) i cink (14%) (EC, 2008).

2.2.PROIZVODI OD JAJA

Kada se govori o proizvodima od jaja, podrazumijevaju se jaja kojima je tijekom prerade uklonjena ljuska. Razlikujemo tekuća jaja, smrznuta jaja te jaja u prahu.

2.2.1. Tekuća jaja

Tekuća pasterizirana jaja predstavljaju homogenu tekućinu blijedo žute do narančaste boje (ovisno o boji žumanjka kao ulazne sirovine), tekuće teksture, mirisa i okusa tipičnog za miris i okus jajeta. Tehnološkim procesima moguće je proizvesti tekuće pasterizirano cijelo jaje, ali također, moguća je i separacija čime nastaje tekući pasterizirani bjelanjak odnosno žumanjak. Organoleptička te svojstva pečenja i emulgiranja ista su kao i kod jaja u ljusci. Primjena im je pojednostavljena obzirom da nema razbijanja ljuske što je važno kod industrijske proizvodnje gdje se olakšava proces kuhanja i pečenja, a kao dodatnu prednost važno je naglasiti mikrobiološku i higijensku ispravnost. Mogućnost prisutnosti bakterije *Salmonella* spp. u jajima i proizvodima od jaja je neprihvatljiva i izuzetno opasna čime se naglašava važnost primjene visoke temperature, odnosno procesa pasterizacije.

Nusproizvod kod proizvodnje tekućih jaja je ljuska i čini 12% mase jajeta. Bogata je kalcijem te, nakon što se toplinski obradi, može imati brojne primjene, poput obogaćivanja poljoprivrednih površina.

Tekuća jaja mogu se pakirati u tetrapak, bag-in-box vrećice, u plastične bačve ili inox tankove te se moraju skladištiti od 0 do +4 °C kako bi se ostvarila što bolja održivost. Trajnost proizvoda je ograničena te je označena na samoj deklaraciji. Fizikalno - kemijska svojstva razlikuju se kod cijelog jajeta, bjelanjka i žumanjka (Lukač d.o.o., 2010).

2.2.1.1. Cijelo jaje

Cijelom jajetu (slika 1) udio suhe tvari se kreće oko 23 %, a pH se kreće između 7.2 i 7.8. Jedna litra cijelog jajeta ima 1.06 kg, odnosno jedan kilogram cijelog jajeta sadrži 0.938 L. Za jedan kilogram jajeta potrebno je oko 20 jaja (prosječne veličine) u ljusci.



Slika 1. Tekuće pasterizirano cijelo jaje (Lukač d.o.o., 2010)

Primjena cijelog tekućeg pasteriziranog jajeta je mnogobrojna – zbog jednostavnosti rukovanja i smanjenog zauzimanja skladišnog prostora, koristi se u restoranima, hotelima, bolničkim, školskim te industrijskim kuhinjama, prilikom proizvodnje tjestenina, slastica itd. (Lukač d.o.o., 2010).

2.2.1.2. Bjelanjak

Tekući pasterizirani bjelanjak (slika 2) je homogena tekućina, blijedo žute boje. Karakterizira ga specifičan sastav obzirom da sadrži izuzetno mali udio masti te ne sadrži kolesterol (Nys i Sauveur, 2004). U odnosu na cijelo jaje, udio suhe tvari je značajno manji i iznosi oko 11%. pH vrijednost je blago lužnata i kreće se od 8.5 do 9.5. (USDA, 2009). Kao što se može vidjeti u tablici 1, nutritivna vrijednost 100 g proizvoda iznosi 47 kcal. Tekući bjelanjak ima 10.6 g proteina te manje od 1 g masti i ugljikohidrata.

Tablica 1. Sastav bjelanjka u 100 g (Nys i Sauveur, 2004)

Nutrijenti	Bjelanjak (100 g)
ENERGETSKA VRIJEDNOST (kcal)	47
PROTEINI (g)	10.6
UGLJIKOHIDRATI (g)	0.8
MASTI (g)	0.1

Kako bi se proizvela jedna litra bjelanjka potrebno je oko 30 bjelanjaka iz jaja s ljuskom te ona teži 1.05 kg, dok jedan kilogram bjelanjka ima 0.948 L.



Slika 2. Tekući pasterizirani bjelanjak (Lukač d.o.o., 2010)

Primjenu bjelanjka pronalazimo u slastičarstvu, ali i zdravoj prehrani sportaša (zbog visokog udjela proteina i niskog udjela masti) (Lukač d.o.o., 2010).

2.2.1.3. Žumanjak

Tekući žumanjak (slika 3) homogena je tekućina žuto - narančaste boje. Kao što se može vidjeti na slici 3, boja je znatno intenzivnija u odnosu na cijelo jaje. Obzirom da je udio suhe tvari oko 42%, ne čudi činjenica da je riječ o proizvodu velike viskoznosti. pH vrijednost se kreće od 6.1 do 6.8 što znači da je žumanjak blago kiseo (USDA, 2009).

Kao što se može vidjeti u tablici 2, nutritivna vrijednost žumanjka na 100 grama iznosi 364 kcal. Žumanjak sadrži visok udio masti (34.5 g), od čega je kolesterol prisutan s čak 1.2 g, dok je udio proteina 16.1 g, a ugljikohidrata 0.5 g.

Tablica 2. Sastav žumanjka u 100 grama (Nys i Sauveur, 2004)

Nutrijenti	Žumanjak (100 g)
ENERGETSKA VRIJEDNOST (kcal)	364
PROTEINI (g)	16.1
UGLJIKOHIDRATI (g)	0.5
MASTI (g)	34.5

Da bi se dobila jedna litra žumanjka potrebno je oko 50 jaja u ljusci i ona kao takva teži 1.08 kg. S druge strane, jedan kilogram žumanjka iznosi 0.925 L.

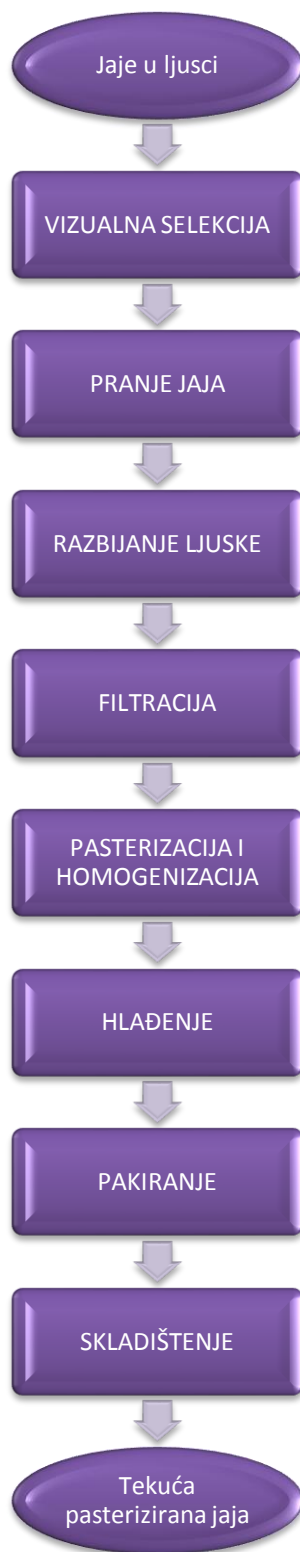


Slika 3. Tekući pasterizirani žumanjak (Lukač d.o.o., 2010)

Tekući žumanjak koristi se u proizvodnji tjestenine, majoneze, slastica i sl. (Lukač d.o.o., 2010).

2.3.TEHNOLOŠKI PROCES PROIZVODNJE TEKUĆIH PASTERIZIRANIH JAJA

Na slici 4 prikazana je blok shema proizvodnje tekućih pasteriziranih jaja.



Slika 4. Blok shema proizvodnje tekućih jaja (EEPA, 2011)

U današnje vrijeme, pogoni za proizvodnju hrane preferiraju tekuća jaja u odnosu na jaja u ljusci obzirom da su jednostavnija za uporabu (Yadav i Vadehra, 1977).

Korak koji prethodi samoj proizvodnji je dolazak sirovine, odnosno jaja u ljusci, u pogon. Ona se moraju adekvatno skladištiti na odgovarajućoj temperaturi ili se mogu odmah koristiti u proizvodnji, ovisno o potrebi.

Po početku proizvodnje jaja prolaze kroz mlaz vode kako bi isprale sve nečistoće i kako bi se kontaminacija svela na minimum. To je važno zato što nečistoće sa ljuske mogu dospjeti u kontakt s unutrašnjim dijelom, tj. tekućim dijelom jajeta te na taj način negativno utjecati na mikrobiološka i nutritivna svojstva. Nakon pranja slijedi sušenje u struji zraka.

Osušena jaja idu na stroj za razbijanje jaja. Kod takvih posebnih strojeva dolazi do razbijanja ljuske i izdvajanja bjelanjka i žumanjka. Ukoliko se proizvodi tekuće cijelo pasterizirano jaje, naknadno dolazi do spajanja bjelanjka i žumanjka. Upravo zbog ovog dijela, u kojem dolazi do kontakta vanjskog dijela ljuske i tekućeg dijela, važno je ispiranje nečistoća.

Nusproizvod koji nastaje – ljuska, odvaja se sa strane i naknadno nosi u sušionik gdje se suši na određenoj temperaturi kroz određeno vrijeme. Ljuska je vrlo važna zato što predstavlja najbolji prirodni izvor kalcija i nakon sušenja se može prodavati i/ili koristiti u prehrani životinja te koristiti za obogaćivanja tla poljoprivrednih površina.

Nakon razbijanja jaja slijedi filtriranje. Ono je važno kako bi se eventualni dio ljuske koji je zaostao u tekućem dijelu otklonio. Ovaj dio proizvodnje je bitan zato što se na kraju želi dobiti proizvod tekuće konzistencije bez krutih dijelova.

Ukoliko se u proizvode dodaju aditivi, oni se dodaju u tankove nakon filtracije.

Slijedi najvažniji dio, a to je pasterizacija popraćena homogenizacijom. Pasterizacija predstavlja toplinski tretman proizvoda koji za cilj ima uništiti patogene bakterije. Kod proizvodnje tekućih jaja ona je izuzetna bitna zato što se njome eliminira svaka mogućnost prisutnosti bakterije *Salmonella* spp.

Proizvodi se najprije podvrgavaju procesu homogenizacije kako bi se dobio što kompaktniji proizvod jednolične strukture. Zatim slijedi pasterizacija čije temperature se razlikuju ovisno o proizvodu; kod bjelanjka, koji ima visok udio proteina, temperature moraju biti puno niže u odnosu na cijelo jaje i žumanjak kako ne bi došlo do koagulacije tih istih

proteina. One se kreću od 50 i 70 °C. Nakon pasterizacije ponovno slijedi homogenizacija koja omogućuje da konačan proizvod bude jednolične teksture, bez mogućnosti odvajanja faza.

Prije pakiranja potrebno je ohladiti proizvod na temperaturu + 4 °C kako bi se prekinuo toplinski tretman. Hlađenje se odvija u zasebnom rashladnom tanku. Nakon što se proizvod adekvatno ohladio, jaja se dovode do punilice te pune u odgovarajuću ambalažu. Postoje punilice za punjenje u aspetičnim uvjetima pri čemu je izuzetno bitno da je ambalaža sterilna kako bi se otklonila svaka mogućnost kontaminacije.

Tekuća jaja se skladište u skladištima pri temperaturnom režimu od 0 do + 4 °C (Lukač d.o.o., 2010).

Razlike u proizvodnom procesu smrznutih i tekućih jaja su minimalne i odnose se samo na temperature skladištenja gotovog proizvoda; tekuća jaja, kako je već napisano, skladište se na temperaturi do +4 °C dok se smrznuta jaja moraju skladištiti na nižim temperaturama, najčešće na -18 °C.

Kod jaja u prahu, tehnološki proces koji prethodi sušenju je isti. Iznimka je kod bjelanjka – proces pasterizacije se može odvijati prije ili poslije sušenja. Najčešće se koristi metoda sprej sušenja gdje je tekućina atomizirana u pari vrućeg zraka i zbog velike površine omogućene atomizacijom, gubitak vode je izuzetno brz. Jaja se najčešće suše na temperaturi između 121 i 123 °C. Prilikom sušenja je važno konstantno filtrirati zrak kako bi se uklonile čestice prašine i drugi mogući kontaminanti. Neki sistemi za sušenje koriste i sekundarno sušenje kako bi se udio vode sveo na minimum. Važno je napomenuti da prije sušenja cijelog jajeta i žumanjka potrebno ukloniti D – (+) – glukozu (dodatkom enzimskog sustava glukoza oksidaza – katalaze) kako ne bi došlo do Maillardovih reakcija i narušavanja stabilnosti te stvaranja neugodnih mirisa kasnije tijekom skladištenja (Stadelman i Cotterill, 1977).

Nakon svake proizvodnje potrebno je oprati i dezinficirati sve podove, vanjske dijelove cijevi i opremu koja je korištena te unutrašnjost svih cijevi i tankova. To se čini adekvatnim sredstvima.

2.4. ADITIVI U TEKUĆIM PASTERIZIRANIM JAJIMA

Prehrambeni aditivi su u Republici Hrvatskoj označeni E brojevima i kao takvi svrstani su u nekoliko različitih kategorija, ovisno o svojim tehnološkim i funkcionalnim svojstvima. Za svaki aditiv postoji maksimalna dopuštena količina koja se može dodavati, a ukoliko ona nije propisana, slijedi se načelo *quantum satis*, odnosno da se smije dodavati ona količina aditiva koja je u skladu s proizvođačkom praksom i sve s ciljem postizanja željenog učinka (Anonymous, 2011).

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (*Codex Alimentarius Commission*) prehrambeni aditivi se definiraju kao: „*tvori poznate kemijske strukture, koji se uobičajeno ne konzumiraju, niti su tipičan sastojak hrane. Dodaju se hrani tijekom tehnološkog postupka proizvodnje, prerade i obrade, pakiranja, transporta i čuvanja. Služe za poboljšavanje organoleptičkih svojstava hrane (boja, okus, miris i konzistencija), njezino konzerviranje i čuvanje. U pravilu su bez prehrambene vrijednosti (uz izuzetak modificiranog škroba i nekih emulgatora) i u uvjetima praktične primjene potpuno bezopasni po ljudsko zdravlje. Pojedini aditivi mogu imati i više tehnoloških djelovanja, ali osnovno svojstvo ovisi o količini koja je dodana u hranu*“ (HAH, 2009).

Prema Regulativi Europske komisije 1333/2008 u jaja i proizvode od jaje može se dodavati niz aditiva. U tekuća pasterizirana jaja dodaju su konzervansi koji djeluju tako da produljuju trajnost jaja usporavajući ili sprječavajući rast mikroorganizama. Konzervansi koji se najviše koriste su sorbinska kiselina i njezine soli (E200 – E203) te benzojeva kiselina i njezine soli (E210 – E213) te njihova maksimalna dopuštena količina je 5000 mg konzervansa na kilogram proizvoda. Nizin (E234) ima sve veću primjenu; riječ je o aditivu s antibiotskim djelovanjem. Nadalje, askorbinska kiselina (E300 – E304) je najčešći antioksidans koji se dodaje u jaja. Oni se dodaju kako bi se produljila trajnost proizvoda. Emulgatori i emulgatorske soli se dodaju kako bi se dobila homogena tekućina. Najčešći emulgatori koji se dodaju su monogliceridi i digliceridi masnih kiselina (E471). Bojila su zabranjena za jaja i sve oblike proizvoda od jaja i ne smiju se dodavati. Jedina iznimka za uporabu bojila je ona za ukrašavanje i žigosanje ljuski jajeta.

Limunska kiselina (E330) je prirodni antioksidans i sredstvo za reguliranje kiselosti i kao takvo potpomaže djelovanju antioksidansa i emulgatora te djeluje i kao konzervans i stabilizator. Soli limunske kiseline (E331 – E333) služe kao stabilizatori i antioksidansi (Anonymous, 2016).

2.5. MIKROBIOLOGIJA TEKUĆIH PASTERIZIRANIH JAJA

U Vodiču za mikrobiološke kriterije u hrani (2011) izdanog od strane Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, zadani su kriteriji za najvažnije mikroorganizme koje je potrebno kontrolirati i stalno ispitivati. U tablici 3 prikazani su mikroorganizmi i kriteriji unutar kojih se moraju nalaziti proizvodi od jaja.

Tablica 3. Mikroorganizmi u proizvodima od jaja (Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, 2011)

MIKROOGANIZMI / NJIHOVI TOKSINI I METABOLITI	PLAN UZORKOVANJA		KRITERIJI
	N	C	
<i>Salmonella</i> spp.	5	0	n.n. u 50 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	n.n. u 25 g
Aerobne mezofilne bakterije	5	1	$m = 10^4$ cfu g ⁻¹ $M = 10^5$ cfu g ⁻¹
<i>Enterobacteriaceae</i>	5	2	$m = 10$ cfu g ⁻¹ $M = 10^2$ cfu g ⁻¹
Koagulaza pozitivni stafilocoki / <i>Staphylococcus aureus</i>	5	0	$M \leq 10$ cfu g ⁻¹
Kvasci i plijesni	5	1	$m = 10$ cfu g ⁻¹ $M = 10^2$ cfu g ⁻¹

n – broj elementarnih jedinica uzorka koji čine uzorak

c – broj jedinica uzorka, u kojima se dobivene vrijednosti ispitivanja mogu nalaziti između 'm' i 'M', pri čemu se uzorak smatra prihvatljivim, ukoliko je dobivena vrijednost ispitivanja u ostalim jedinicama uzorka jednaka 'm' ili manja od 'm'

m – granična vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućim

M – granična dopuštena vrijednost iznad koje se rezultati smatraju ne zadovoljavajućim; ukoliko sam jedan rezultat nadilazi tu vrijednost, uzorak je nezadovoljavajući

n.n. – nije nađeno

Kao što se može vidjeti u tablici 3, *Salmonella* spp. mora biti odsutna u 50 grama ispitivanog uzorka, dok *Listeria monocytogenes* ne smije biti prisutna u 25 g uzorka.

Ukoliko se radi analiza 5 uzoraka, broj aerobnih mezofilnih bakterija mora biti manji od 10^4 cfu g⁻¹, uz mogućnost iznimke jednog uzorka koji može biti do 10^5 cfu g⁻¹. Pod istim uvjetima analize (ispitivanjem 5 uzoraka), *Enterobacteriaceae*, koagulaza pozitivni stafilocoki / *Staphylococcus aureus* te kvasci i plijesni u ispitivanom uzorku moraju biti prisutni manje od

10 cfu g⁻¹. Iznimka su *Enterobacteriaceae* i kvasci i plijesni gdje jedan uzorak može sadržavati 10² cfu g⁻¹.

2.6. FUNKCIONALNE KARAKTERISTIKE JAJA

Jaja se smatraju multifunkcionalnom namirnicom i čine važne i poželjne sastojke u prehrambenoj industriji obzirom na njihova funkcionalna svojstva koja uključuju koaguliranje, želiranje, formiranje pjene, emulgiranje, zatim daju boju, okus te određene nutritivne karakteristike (Yang i Baldwin, 1995).

Široka primjena jaja zasnovana je na činjenicama da tekuća jaja kaoguliraju ili se zgusnu tijekom zagrijavanja; zatim sposobnosti stvaranja pjene bjelanjka što omogućuje proizvodnju lakših i prozračnijih proizvoda i emulgirajuća sposobnost žumanjka (fosfolipida i lipoproteina) pri čemu dolazi do proizvodnje niza proizvoda (majoneze, različitih umaka i sl.) (Davis i Reeves, 2002).

Međutim, jaja prije svega moraju biti mikrobiološki ispravna. Kod velikog broja proizvoda gdje se proizvodi od jaja koriste kao sirovina, oni se termički ne obrađuju i stoga je izuzetno važno primijeniti adekvatan način tretiranja početne sirovine – jaja u ljusci.

2.6.1. Topljivost proteina

Topljivost proteina predstavlja jedno od najvažnijih funkcionalnih svojstava obzirom da proteini moraju biti topivi kako bi bili primjenjivi u hrani (Vaclavik i Christian, 2003). Ona ovisi o jako puno faktora, poput sastava aminokiselina, stanja proteina, pH, temperature, tlaka, koncentracije soli, koncentracije proteina i nekih drugih komponenti poput polimera, lipida i sl. (Vojdani, 1996).

Topljivost proteina povezana je s pH i minimalna je kod izoelektrične točke (pI), (Bolontrade i sur., 2003). Kod proteina bjelanjka prosječna pI iznosi između 5,3 i 5,4 te u ovom intervalu proteinu su manje topivi (Gaonkar i sur., 2010).

Važnost topljivosti proteina može se vidjeti u činjenici da utječu na sposobnost stvaranja pjene, emulgirajuća svojstva, povećanja viskoznosti, svojstva želiranja i sl. Dakle, ta druga funkcionalna svojstva ovise o topljivosti proteina (Assis i sur., 2010).

Topljivost je jedna od najboljih mjera proteinske denaturacije i agregacije, ali isto tako i dobar pokazatelj proteinske funkcionalnosti. Općenito, proteini koji početno opstaju u denaturiranom, djelomično agregiranom stanju, obično pokazuju nedovoljnu sposobnost sudjelovanja u želiranju, emulgiranju i pjenjenju (Režek Jambrak, 2008).

2.6.2. Pjenjenje

Pjenjenje se definira kao stvaranje i stabilizacija mjehurića zraka u tekućini (Režek Jambrak, 2008). Pjena je koloidna disperzija zraka u tekućoj fazi. Dobri površinski aktivni proteini moraju brzo migrirati prema granici, lako odmotavati i imati relativno visoku viskoznosti i elastičnost kako bi činili stabilni film (Clarkson i sur., 1999). Čiste tekućine ne stvaraju pjene, ali tekućine koje sadrže površinski aktivne komponente koje sudjeluju u formiranju pjene, poput proteina, savršeno odgovaraju svrsi (Yang i Baldwin, 1995).

Iako velik broj različite vrste hrane ima sposobnost stvaranja pjene, jaja ipak prednjače obzirom na njihovu visoku efikasnost. Jaja u odgovarajućim uvjetima stvaraju pjenu velikog volumena, koja je stabilna i koja koagulira tijekom zagrijavanja (Yang i Baldwin, 1995).

Više od 24 različita proteina identificirana su i izolirana u bjelanjku (Mine i Shahidi, 2006) od kojih su najznačajniji ovalbumin (54 %), ovotransferin (12 %), ovomukoid (11 %), ovomucin (3,5 %) i lizozim (3,4 %) (Stadelman i Cotterill, 1995; Mine, 1995). Upravo zbog činjenice da ti proteini imaju različite uloge kod pjenjenja, odnosno kod stabilizacije pjene, bjelanjak ima odlične karakteristike pjenjenja (Alleoni, 2006). Ovalbumin je najzastupljeniji i najvažniji protein i ima centralnu ulogu kod pjenjenja bjelanjaka. Tijekom tučenja, molekule ovalbumina su adsorbirane na međupovršinu zrak – voda; hidrofobni krajevi proteina su usmjereni prema plinovitoj fazi, dok su hidrofilni krajevi usmjereni prema tekućoj fazi (Yang i sur., 2009). Obzirom da ovalbumin je jedini protein bjelanjka koji sadrži slobodnu sulfhidrilnu grupu, pjena koja je proizvedena s ovalbuminom je stabilnija u odnosu na one s disulfidnim vezama (Lechevalier i sur., 2003).

Formiranje pjene ovisi o sposobnosti proteinskih lanaca da se otvore i usmjere na međupovršine tekućina zrak (Režek Jambrak, 2008). Jedan od glavnih faktora koji utječu na formiranje pjene je sposobnost proteina da bude adsorbirana na zrak – voda granici te da se može podvrgnuti brzim konformacijskim promjenama. Ovalbumin i ovotransferin prolaze kroz promjene sekundarne strukture tijekom pjenjenja tako što α – uzvojnice prelazi u β – naborane ploče. Također, pokazalo se kako ovotransferin povećava površinu hidrofobnosti, što je važno za stabilnost pjene. Lizozimi ne podliježu konformacijskim promjenama na granici zrak – voda, ali pridonose sinergiji proteina tijekom pjenjenja tako što su uključeni u elektrostatske interakcije s drugim proteinima (Lechevalier i sur., 2003).

Ranija istraživanja su pokazala kako je dodatak jednog žumanjka u 30 mL bjelanjka dovoljan da se reducira volumen pjene s 135 mL na 40 mL (Kobayashi i sur., 1980).

Neke statističke analize pokazale su kako industrijski procesi proizvodnje utječu na funkcionalne karakteristike tekućih pasteriziranih jaja. Lechevalier i suradnici (2005) pokazali su redukciju od 8 % u stabilnosti pjene ako se gleda uzorak prije i poslije procesiranja.

Mnoge karakteristike utječu na karakteristike pjenjenja uključujući dodatak soli, šećera, pH i uvjete procesiranja. Pokazala se kako je bjelanjak najstabilniji kod svoje prirodne pH vrijednosti (8,6).

Vrijeme tučenja povećava sposobnost stvaranja pjene, međutim prekomjerno tučenje može smanjiti stabilnost pjene tako što se počnu stvarati manji mjehurići. Pasterizacija smanjuje sposobnost pjenjenja obzirom da nastaje ovomucin – lizozim kompleks i ovotransferin se denaturira pri temperaturi od 54 °C (Lomakina i Mikova, 2006).

Pad pjene se može se opisati pomoću tri osnovna principa:

1. izdvajanje tekućine, gdje tekućina istječe iz pjene kao posljedica gravitacije i pjena se suši.
2. spajanje mjehurića, gdje dolazi do rupture između filma dva mjehurića, nakon čega se oni spajaju u jedan veći mjehurić.
3. disproporcionalnost pjene, gdje plin difundira iz manjeg mjehurića u veći zbog većeg pritiska u većem mjehuriću; rezultat je povećanje većih mjehurića (Bisperink i sur., 1992).

2.6.3. Emulgiranje

Emulzije u hrani su sustavi s dvije faze između dvije tekućine koje se ne miješaju, čija stabilnost varira. Jedna faza je u obliku sitno podijeljenih kapljica čiji je promjer obično veći od 0,1 μm . Ta disperzirana, unutrašnja ili diskontinuirana faza je suspendirana u kontinuiranoj ili vanjskoj fazi.

Emulzije mogu biti podijeljene u dvije kategorije:

1. one kod kojih su kapljice ulja disperzirane u vodenoj fazi, tzv. emulzije ulje u vodi (U/V)
2. one kod kojih su kapljice vode disperzirane u uljnom mediju; poznate kao emulzije voda u ulju (V/U).

Većina emulzija kod hrane su ulje u vodi. Žumanjak je sam po sebi emulzija, disperzija kapljica ulja u kontinuiranoj fazi vodenih komponenti. Upravo zbog toga je žumanjak učinkovito emulgirajuće sredstvo (Yang i Baldwin, 1995).

Obzirom da kapacitet emulgiranja proteina direktno ovisi o topljivosti, svi uzroci koji smanjuju topljivost utjecat će na snižavanje kapaciteta emulgiranja. Kod nativnih proteina emulgirajuća sposobnost je veća što je manji stupanj denaturacije.

Prema Pearce i Kinsella (1978), indeks aktiviteta emulzije predstavlja površinu međufaze koju može stabilizirati jedan gram proteina. U emulzijama koje su stabilizirane proteinima, upravo proteini osiguravaju nastanak međufazne membrane oko masne globule čime se sprječava flokulacija, koalescencija i izdvajanje ulja (Režek Jambrak, 2008).

Kada se voda i ulje homogeniziraju, oni se brzo razdvajaju u dva sloja, jedan sloj je ulje koje ima veliku gustoću, a drugi čini voda koja ima nisku gustoću. Dolazi do razdvajanja faza zbog težnje za spajanjem kapljica sa sličnim kapljicama koje se nalaze u blizini. Da bi se dobila stabilna emulzija, gledajući kratkoročno ili dugoročno, važno je dodati emulgator – površinski aktivne molekule koje omogućuju homogenizaciju dvije faze (Söderberg, 2013).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.MATERIJAL

3.1.1. Uzorci tekućih pasteriziranih jaja

U istraživanju su korišteni uzorci tekućih pasteriziranih jaja dobiveni od hrvatskog proizvođača iz Zagreba (Lukač d.o.o.). Jaja u ljusci koja su služila kao sirovina za proizvodnju tekućih pasteriziranih jaja su od istog proizvođača. Temperatura na kojoj je provedena pasterizacija je 66 °C, a protok 1000 L h⁻¹.

Uzorci su pakirani u sterilne vrećice polimernog materijala (Optopack Ltd.) od 1 kg koje su bile zaštićene unutar peteroslojne kutije (DS Smith Belišće Croatia d.o.o.), tzv. *bag in box* pakiranje. Od pogona do laboratorija održavao se odgovarajući temperaturni režim od 0 °C do +4 °C.

U svrhu istraživanja pripremljeni su uzorci tekućih cijelih pasteriziranih jaja s tri različite koncentracije limunske kiseline:

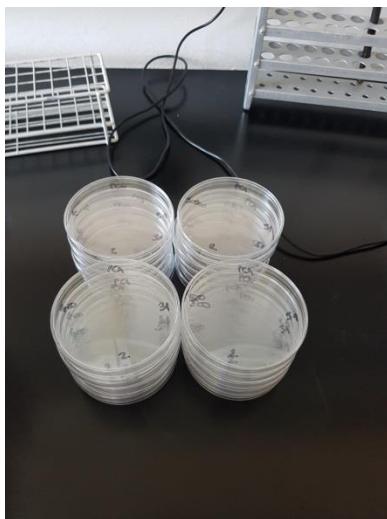
1. kontrola – bez dodatka limunske kiseline - OZNAKA "K"
2. 300 mg L⁻¹ – OZNAKA "300"
3. 400 mg L⁻¹ – OZNAKA "400"
4. 500 mg L⁻¹ - OZNAKA "500"

U sva četiri uzorka bio je konstantan dodatak konzervansa kalijeveg sorbata (C₆H₇KO₂), u količini od 2,7 g L⁻¹.

3.2.METODE

3.2.1. Određivanje ukupnog broja mikroorganizama

Aerobne mezofilne bakterije određene su prema standardu HRN EN ISO 4833:2008. Prije početka mikrobiološkog ispitivanja pripremljena je podloga i fiziološka otopina. Podloga je pripremljena tako što je dehidrirana hranjiva podloga PCA (*Plate – Count – Agar*) otopljena u destiliranoj vodi prema uputi proizvođača. To se zatim kuhalo do pojave mjehurića, a nakon hlađenja steriliziralo u autoklavu i ostavilo na hlađenje na temperaturi hladnjaka. Fiziološka otopina je također sterilizirana i zatim ostavljena na temperaturu okoline. Na slici 5 su prikazane označene sterilne Petrijeve zdjelice.



Slika 5. Pripreme Petrijevih zdjelica za rad (vlastita fotografija)

Određivanje aerobnih mezofilnih bakterija provedeno je metodom brojanja poraslih kolonija nakon inkubacije nacijepljenih odgovarajućih decimalnih razrjeđenja na odgovarajuće hranjive podloge. Sva površina je prethodno sterilizirana alkoholom i radilo se uz prisustvo upaljenog plamenika. 10 g uzoraka pomiješano je s 90 mL fiziološke otopine i homogenizirano u homogenizatoru (Stomacher) pri čemu je dobiveno razrjeđenje 10^{-1} . Razrjeđenje 10^{-2} dobiveno je tako da je 1 mL dobro homogeniziranog razrjeđenja 10^{-1} preneseno u epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine sterilnom tehnikom rada. Nakon homegenizacije, na isti način urađeno je i razrjeđenje 10^{-3} . Istovremeno je 1 mL uzorka prenesen u sterilnu Petrijevu zdjelicu,

kao i sljedeća razrjeđenja. Postupak je ponavljan do razrjeđenja 10^{-4} . Epruvete su homogenizirane električnim vibratorom.

U toku rada PCA je otopljen i ohlađen na $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon što su u Petrijeve zdjelice prenesena odgovarajuća razrjeđenja, ohlađena hranjiva podloga sterilno je izlivena u njih. Kružnim pokretima Petrijevih zdjelica, u obliku broja 8, uzorci su dobro homogenizirani i ostavljeni na temperaturi okoline da podloga očvrstne. Nakon toga su Petrijeve zdjelice s čvrstom podlogom prenesena u termostat na inkubaciju pri $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz 72 sata.

Pomoću brojača kolonije određivan je broj poraslih bakterija na PCA nakon 24 – 48 sati. Najprije se broje sitne sivkasto – bijele, okrugle ili elipsoidne kolonije (promjera $0.5 - 2\text{ mm}$), zatim žute, crvene ili narančaste kolonije raznih oblika i veličina. Mogu narasti i plijesni pa se one broje zasebno i uz njihov broj se naznači da se radi o plijesnima.

Račun:

Nakon što se izbroje porasle kolonije na odabranom decimalnom razrjeđenju, izračunata je CFU vrijednost (*Colony – Forming Units*) pomoću sljedeće formule:

$$\text{CFU} = (\text{broj poraslih kolonija} / \text{volumen upotrebljenog uzorka}) \times \text{recipročna vrijednost decimalnog razrjeđenja} \quad (1)$$

gdje je:

CFU – jedinice koje tvore kolonije

CFU vrijednost je izražena u st g^{-1} .

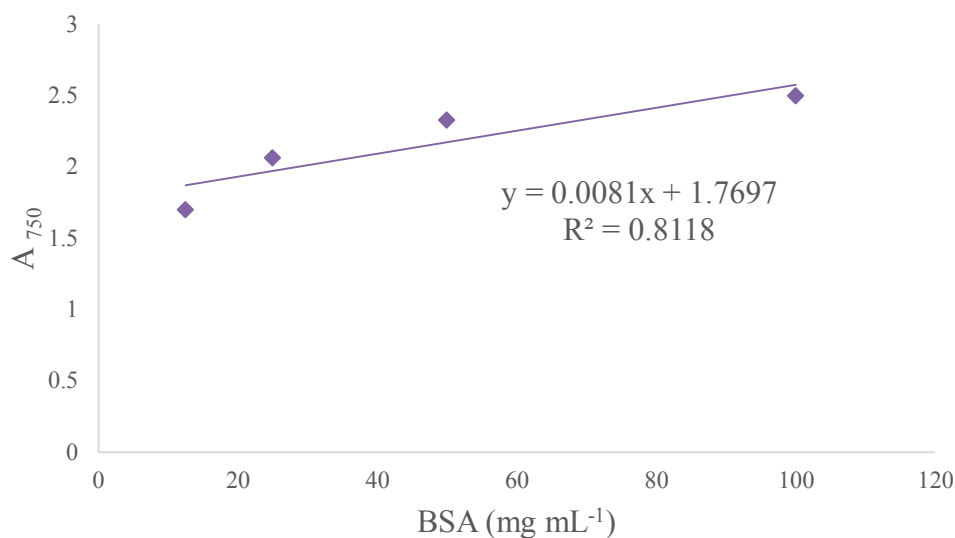
3.2.2. Određivanje topljivosti proteina

Za određivanje topljivosti proteina korištena je metoda po Lowry-ju i sur. (1951).

Najprije su uzorci tekućih pasteriziranih jaja centrifugirani 10 minuta na 10 000 g pri temperaturi od 18 °C. Dobiveni supernatant korišten je dalje u metodi.

U epruvete od 10 mL dodano je 100 µL supernatanta, 500 µL reaktanta A (*Dc Protein Assay Reagent A*) i 4 mL reaktanta B (*Dc Protein Assay Reagent B*). Zatim je epruveta miješana na tresilici 30 sekundi. Nakon što je 15 – 20 minuta stajalo na temperaturi okoline, izmjerena je apsorbancija na 750 nm.

Kako bi se mogla izračunati koncentracija iz dobivene apsorbancije, izrađen je baždarni dijagram (slika 6).



Slika 6. Baždarni dijagram

Gdje je:

y – apsorbancija pri 765 nm

x – koncentracija BSA (bovin serum albumin) (mg mL⁻¹)

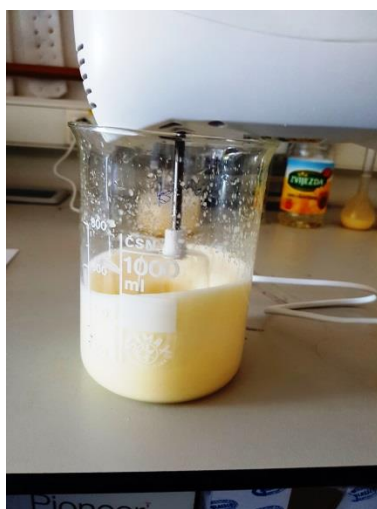
R² – koeficijent determinacije

Koncentracija topljivih proteina izražava se u mg mL⁻¹.

3.2.3. Određivanje značajki pjenjenja

Od značajki pjenjenja, u ovom istraživanju određivalo se povećanje volumena pjene i stabilnost pjene. Najprije je bilo potrebno napraviti 15 %-tnu otopinu jaja (30 mL jaja otopljeno u 200 mL destilirane vode).

Povećanje volumena pjene određeno je metodom po Phillips i sur. (1987). 100 mL pripremljene 15 %-tne otopine jaja se miješalo u čaši od 1000 mL mikserom pri najvećoj brzini kroz 2 minute (slika 7). Nakon što je 2 minute stajalo na temperaturi okoline, očitalo se povećanje volumena.



Slika 7. Miješanje jaja mikserom (vlastita fotografija)

Račun:

Kapacitet pjenjenja izračunat je kao postotak povećanja volumena pomoću slijedeće jednačbe:

$$\% \text{ povećanje} = ((V_2 - V_1) / V_1) \times 100 \quad (2)$$

gdje je:

V_2 – volumen pjene (mL)

V_1 – početan volumen uzorka (mL).

Stabilnost pjene određena je tako što se izmjerio volumen izdvojene tekućine nakon 10 minuta. Izražena je formulom:

$$\% \text{ izdvojene tekućine} = V_d / V_0 \times 100 \quad (3)$$

gdje je:

V_d – volumen izdvojene tekućine (mL)

V_0 – početni volumen uzorka (mL).

3.2.4. Određivanje emulgirajućih svojstava

Mutnoća emulzije određena je prema metodi Webb i sur. (2002). Određuje se mjerenjem apsorbancije emulzije na spektrofotometru. Na osnovu dobivene vrijednosti računa se vrijednost mutnoće.

Za određivanje mutnoće potrebno je pripremiti 3 % - tnu suspenziju (3 mL otopljeno u 100 mL destilirane vode). Pripremljena suspenzija se pomiješala s komercijalnim suncokretovim uljem (Zvijezda d.d.) u omjeru 2:1 (20 mL 3% suspenzije jaja i 10 mL ulja) u plastičnim Falcon epruvetama. Nakon toga slijedilo je miješanje mikserom kroz 90 sekundi. Dobivenoj emulziji izmjerena je apsorbancija pri 500 nm u kiveti debljine 1 cm.

Račun:

Mutnoća se računa prema slijedećoj formuli:

$$T = 2,303 \times (A / I) \quad (4)$$

gdje je:

T – mutnoća

A – apsorbancija kod 500 nm

I – debljina kivete (m)

Indeks aktiviteta emulzije također je izračunat prema metodi Webb i sur. (2002) i računa se iz izraza:

$$IAE = 2 \times T \times (A \times r / C \times \Theta \times 1000) \quad (5)$$

gdje je:

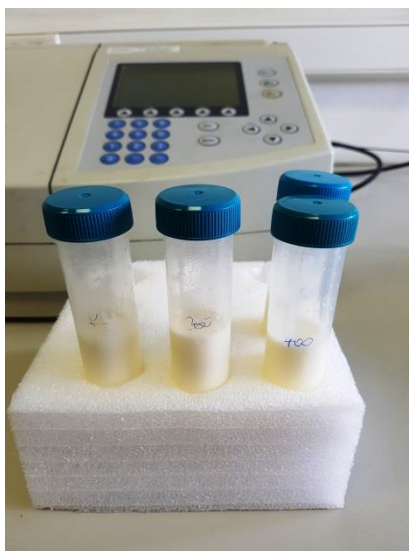
IAE – indeks aktiviteta emulzije

Θ – volumni udio uljne faze (mL)

R – faktor razrjeđenja

C – masa proteina u jedinici volumena vodene faze prije pripreme emulzije (g)

Stabilnost emulzije određena je tako da se prethodno pripremljena emulzija ostavi na +4 °C kroz 24 sata te se ponovno izmjeri apsorbancija na 500 nm te računa mutnoća prema gore već napisanoj formuli. Na slici 8 prikazani su uzorci nakon 24 sata hlađenja neposredno prije nego što je izmjerena apsorbancija.



Slika 8. Uzorci nakon hlađenja prije određivanja apsorbancije (vlastita fotografija)

Prema metodi Zhao i sur. (2007) određena su emulgirajuća svojstva na 20 °C. Prvo je pripremljena 5 % - tna otopina (5 mL jaja u 100 mL destilirane vode). 50 mL pripremljene otopine i 50 mL komercijalnog suncokretovog ulja homogenizirani su pomoću Ultraturaxa u čašama od 250 mL kroz 2 minute s ciljem dobivanja emulzije ulja u vodi. Po 30 mL dobivene emulzije prebačene su u tri Falcon epruvete od 50 mL te ostavljene na temperaturi okoline kroz 90 minuta nakon čega je mjeren volumen emulzificirajućeg sloja.

Račun:

Kapacitet emulzije (KE) je izračunat prema formuli:

$$\% \text{ KE} = (V_E / V_1) \times 100 \quad (6)$$

gdje je:

V_E – volumen emulzificirajućeg sloja (mL)

V_1 – početan volumen uzorka pasteriziranih jaja (mL).

Stabilnost emulzije određena je tako što su prethodno pripremljene Falcon epruvete, nakon mjerenja volumena emulzificirajućeg sloja, stavljene u vodenu kupelj na 80 °C kroz 30 minuta. Nakon toga su ohlađene pod mlazom vode na 20 °C.

Račun:

Volumen emulzificirajućeg sloja (SE) je očitao, a stabilnost emulzije izračunata prema formuli:

$$\% SE = (V_{E2} / V_{E1}) \times 100 \quad (7)$$

gdje je:

V_{E2} – volumen emulzificirajućeg sloja koji ostaje nakon zagrijavanja (mL)

V_{E1} – početan volumen emulzificirajućeg sloja (mL).

3.2.5. Statistička analiza

U cilju da se utvrdi statistički utjecaj vremena skladištenja te udjela limunske kiseline na izlazne parametre kvalitete jaja za planiranje, dizajn i obranu podataka korišten je računalni program STATGRAPHICS Centurion (StatPoint tehnologija, Inc). Napravljen je dizajn eksperimenta prema Multifactor Categorical Design. Rezultati su obrađeni prema multifaktorijalnoj analizi varijance (MANOVA) sa razinom značajnosti od 95 %.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu je ispitan utjecaj različitih koncentracija limunske kiseline (300, 400 i 500 mg L⁻¹) u tekućim pasteriziranim jajima tijekom skladištenja kroz 4 tjedna na topljivost proteina, značajke pjenjenja, emulgirajuća svojstva te mikrobiološku ispravnost.

Dobiveni rezultati prikazani su tablično i grafički, a prikazane vrijednosti predstavljaju srednju vrijednost dvije ili tri repeticije uz standardnu devijaciju. U tablici 4 prikazan je broj bakterija kroz tjedne skladištenja ovisno o koncentraciji limunske kiseline. Na slikama 9 - 21 grafički su prikazani rezultati određivanja funkcionalnih svojstava pasteriziranih tekućih jaja uz dodatak različitih koncentracija limunske kiseline kroz 4 tjedna skladištenja.

4.1.ODREĐIVANJE UKUPNOG BROJA MIKROORGANIZAMA

Utjecaj dodataka različitih koncentracija limunske kiseline na broj poraslih aerobnih mezofilnih bakterija prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Utjecaj različitih koncentracija limunske kiseline na broj bakterija tijekom skladištenja

	1.tjedan	2.tjedan	3.tjedan	4.tjedan
broj bakterija CFU g ⁻¹ K	-	3×10^3	3×10^5	3×10^6
broj bakterija CFU g ⁻¹ 300	-	8×10^3	$1,8 \times 10^4$	9×10^4
broj bakterija CFU g ⁻¹ 400	-	3×10^2	$4,6 \times 10^3$	5×10^4
broj bakterija CFU g ⁻¹ 500	-	2×10^2	$2,5 \times 10^3$	3×10^4

Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije u hrani (2011) maksimalan broj aerobnih mezofilnih bakterija koji se smije naći u proizvodima od jaja iznosi 10^5 CFU g⁻¹.

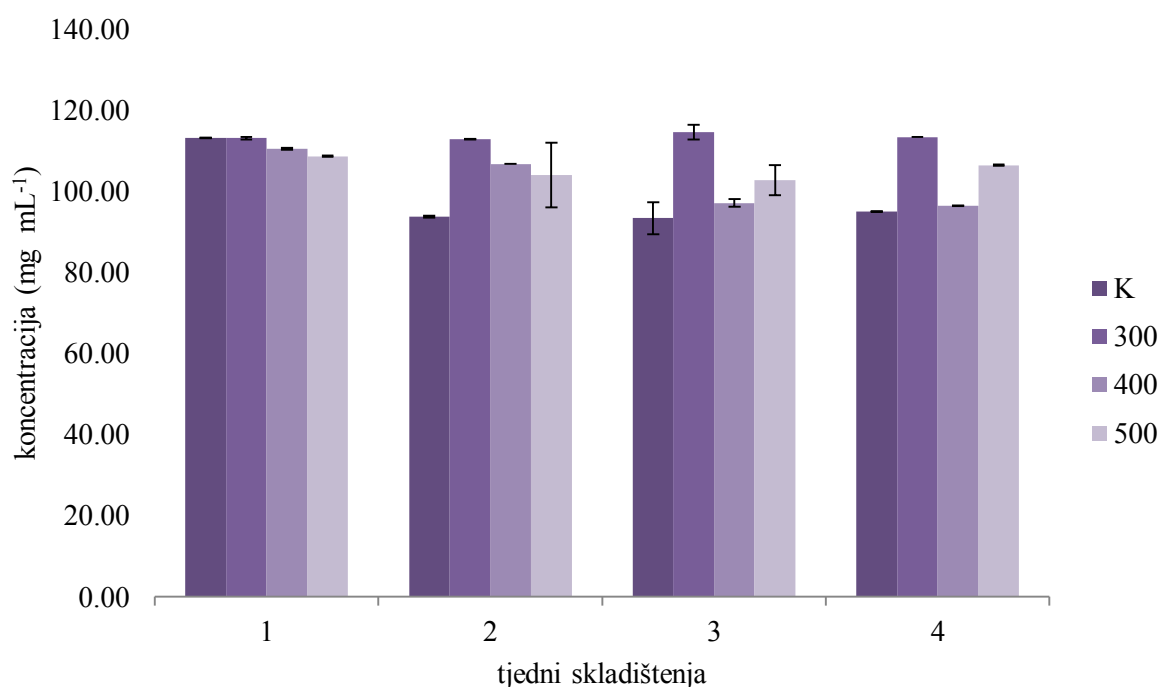
Broj bakterija kontrolnog uzorka u koji nije dodana limunska kiselina pokazao je najbrži rast pa je broj bakterija poraslih nakon 2 tjedna skladištenja uzorka bio 3×10^3 , nakon 3 tjedna 3×10^5 , a nakon 4 tjedna skladištenja čak 3×10^6 . Može se zaključiti da je kontrolni uzorak bio mikrobiološki ispravan samo u prva dva tjedna.

S druge strane, pokazalo se kako dodatak kiseline ima inhibitorno djelovanje na rast bakterija. Uzorci s 300 mg L⁻¹ limunske kiseline pokazuju redukciju rasta bakterija za jednu log jedinicu u uzorcima skladištenim 3 tjedna te za čak dvije log jedinice u uzorcima skladištenim 4 tjedna u odnosu na kontrolni uzorak. Isti trend s još boljom redukcijom rasta pokazuje daljnje zakiseljavanje uzoraka pasteriziranih cijelih jaja. Najznačajniji rezultati redukcije broja bakterija stoga je dobiven upotrebom 500 mg L⁻¹ limunske kiseline.

Dosadašnja istraživanja pokazala su kako dodatak limunske kiseline (odnosno snižavanje pH vrijednosti) u kombinaciji s procesom pasterizacije ima pozitivan utjecaj na konzerviranje pasteriziranih cijelih jaja, tj. na redukciju broja bakterija, a samim tim i na produljenja roka trajnosti. Također, zaključeno je kako dodatak limunske kiseline ima najznačajnije rezultate u usporedbi sa drugim kiselinama ili načinima zakiseljavanja (Kretzschmar – McCluskey, 2007). Sukladno tome, ideja je bila ispitati utjecaj dodatka različitih koncentracija limunske kiseline na funkcionalna svojstva i mikrobiologiju tekućih pasteriziranih jaja.

4.2. ODREĐIVANJE TOPLJIVOSTI PROTEINA

Na slici 9 prikazani su rezultati utjecaja dodataka različitih koncentracija limunske kiseline na topljivost proteina pasteriziranog uzorka jaja.



Slika 9. Utjecaj različitih koncentracija limunske kiseline na topljivost proteina tijekom skladištenja

Iz rezultata se vidi kako se topljivost proteina uzorka u koji nije dodana limunska kiselina, tj. kontrolnog uzorka smanjuje povećanjem duljine skladištenja uzorka i to za 17,13 % već tijekom prva dva tjedna skladištenja (sa 113.2 % na 93,4%) nakon čega ostaje gotovo

konstantna do završetka skladištenja. Takav efekt smanjenja topljivosti proteina jaja prisutnih u uzorku može se objasniti denaturacijom proteina odnosno uništavanjem njihove tercijarne i kvarterne strukture čime se intenziviraju reakcije agregacije između njih, a posljedično smanjuje njihova topljivost (Yang i sur., 2009; Wang i Tu, 2008).

Blaga promjena pH vrijednosti, odnosno dodatak limunske kiseline u količini od 300 mg L⁻¹ u uzorku pokazala je izrazito pozitivan utjecaj na svojstva topljivosti proteina. Koncentracija topljivih proteina nakon tjedan dana skladištenja iznosila je 113,2 mg mL⁻¹ jaja te se daljnjim skladištenjem promijenila za oko tek 0,24 %.

S druge strane, dodatak limunske kiseline u ispitivane uzorke u količini od 400 i 500 mg L⁻¹ nije se pokazao dobrim na očuvanje topljivosti proteina. Dodatkom 400 mg L⁻¹ kiseline topljivost se smanjuje za 3,40 % nakon dva tjedna skladištenja (sa 110,5 mg mL⁻¹ na 106,77 mg mL⁻¹) te za 12,68 % u preostalom periodu skladištenja (sa 110,5 mg mL⁻¹ na 96,5 mg mL⁻¹). Nešto bolji rezultati topljivosti ostvareni su dodatkom 500 mg L⁻¹ limunske kiseline gdje se početna topljivost, određena nakon tjedan dana skladištenja (108,7 mg mL⁻¹) do završetka vremena skladištenja (106,5 mg mL⁻¹) smanjila za 2,04 %.

Iz ovih rezultata vidljivo je kako dodatak limunske kiseline u količini od 300 mg L⁻¹, odnosno blaga promjena pH, tijekom 4 tjedna skladištenja imao pozitivan utjecaj na očuvanje topljivosti proteina tijekom cijelog perioda skladištenja, što se ne može zaključiti za veći dodatak limunske kiseline i ekstremnije promjene pH vrijednosti.

U tablici 5 i 6 prikazani su statistički obrađeni rezultati dobiveni određivanjem topljivosti proteina.

Tablica 5. Analiza varijance za topljivost proteina

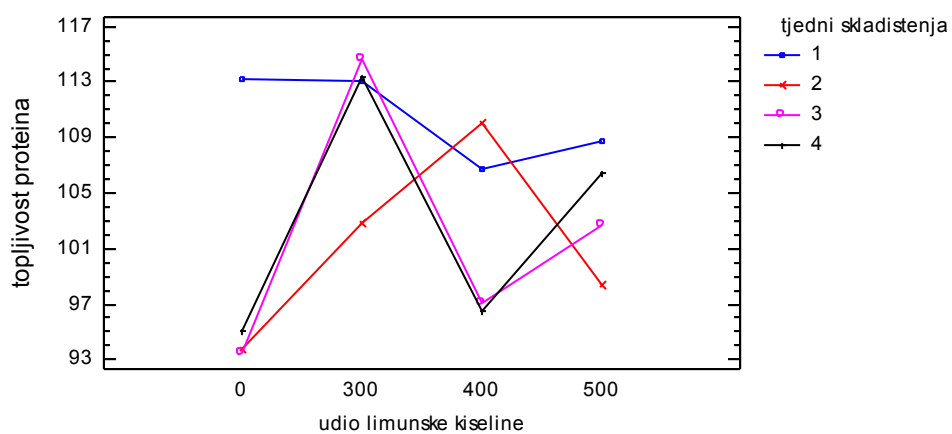
<i>Izvor</i>	<i>Suma kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednje odstupanje</i>	<i>F-veličina</i>	<i>p-vrijednost</i>
A:udio limunske kiseline	615,04	3	205,01	97,59	0,000
B:tjedni skladištenja	433,85	3	144,62	68,84	0,000
Interakcija					
AB	699,24	9	77,69	36,98	0,000
Ukupna pogreška	33,61	16	2,10		
Ukupna korekcija	1781,73	31			

Statističkom obradom podataka, gdje su kao faktori uzeti udio limunske kiseline (mg L^{-1}) i tjedni skladištenja, pokazalo se kako su oba faktora, kao i njihova interakcija, statistički signifikantni ($p < 0,05$) (tablica 5).

Tablica 6. Prikaz metode najmanjih kvadrata za topljivost proteina s 95 % značajnosti

<i>Nivo</i>	<i>Broj</i>	<i>Srednja vrijednost</i>	<i>Standardna pogreška</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maksimum</i>
Ukupna srednja vrijednost	32	104,14			
udio limunske kiseline					
0	8	98,87	0,51	97,78	99,95
300	8	110,98	0,51	109,89	112,07
400	8	102,63	0,51	101,54	103,72
500	8	104,07	0,51	102,98	105,15
tjedni skladištenja					
1	8	110,44	0,51	109,35	111,53
2	8	101,27	0,51	100,19	102,36
3	8	101,98	0,51	100,90	103,07
4	8	102,85	0,51	101,76	103,93
udio limunske kiseline / tjedni skladištenja					
0,1	2	113,19	1,02	111,01	115,36
0,2	2	93,81	1,02	91,63	95,98
0,3	2	93,43	1,02	91,26	95,60
0,4	2	95,04	1,02	92,87	97,21
300,1	2	113,13	1,02	110,95	115,30
300,2	2	102,82	1,02	100,64	104,99
300,3	2	114,61	1,02	112,43	116,78
300,4	2	113,37	1,02	111,20	115,54
400,1	2	106,77	1,02	104,59	108,94
400,2	2	110,10	1,02	107,93	112,27
400,3	2	97,14	1,02	94,96	99,31
400,4	2	96,52	1,02	94,35	98,69
500,1	2	108,68	1,02	106,51	110,85
500,2	2	98,37	1,02	96,20	100,54
500,3	2	102,76	1,02	100,58	104,93
500,4	2	106,46	1,02	104,28	108,63

Na slici 10 prikazana je interakcija udjela limunske kiseline na topljivost proteina kroz tjedne skladištenja.



Slika 10. Prikaz interakcije udjelu limunske kiseline na topljivost proteina kroz tjedne skladištenja

Kao što se može vidjeti na slici 10, topljivost proteina je bila najveća u 3. tjednu skladištenja kod uzorka s 300 mg L⁻¹ limunske kiseline, dok je najmanja topljivost određena u 2. tjednu skladištenja na kontrolnom uzorku.

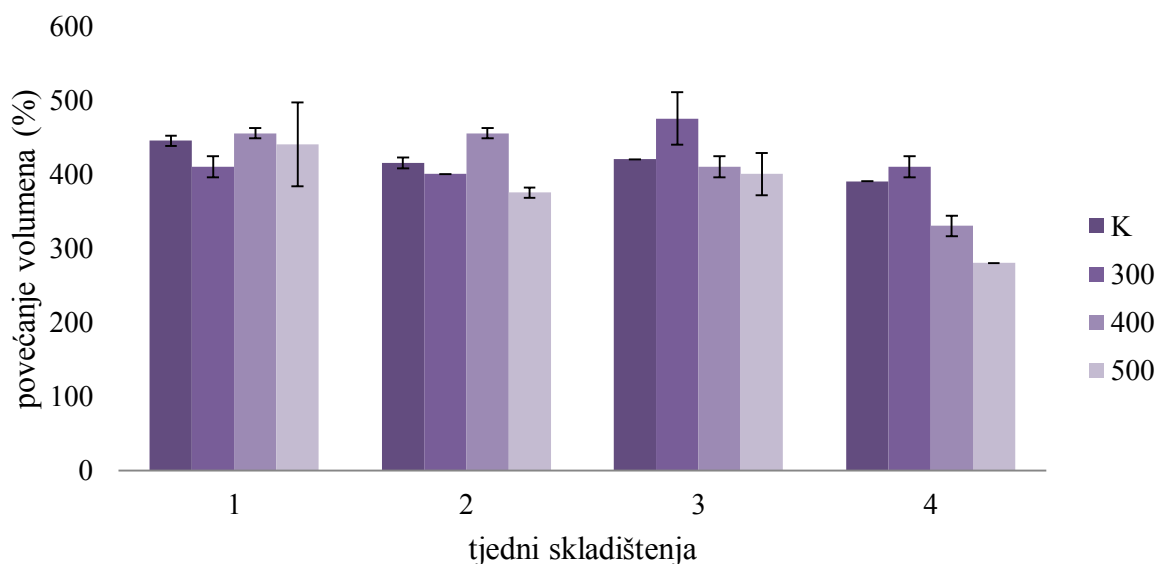
4.3. ODREĐIVANJE ZNAČAJKI PJENJENJA

Svojstvo pjenjenja smatra se jednim od najvažnijih površinskih karakteristika molekula proteina. Dokazano je da globulin i albumin bjelanjka imaju važnu ulogu u formiranju pjene, dok su ovomucin i lizosomi jajeta odgovorni za stabilnost pjene (Li i Zang, 2009). Pjena koja nastane tučenjem je izrazito termodinamički nestabilna, a na njenu stabilnost veliki utjecaj imaju starost korištenih jaja odnosno vrijeme skladištenja, vrijeme i intenzitet tučenja, predtretmani poput homogenizacije i pasterizacije, tretiranje ultrazvukom ili gama zrakama, centrifugiranje, zatim temperatura uzoraka, pH vrijednost, dodatak ostalih aditiva poput soli ili šećera, stabilizatora, zaslađivača, miješanje bjelanjka sa žumanjkom, prisutnost metalnih kationa i proteolitičkih enzima (Lomakina i Mikova, 2006).

Kao što je i prije spomenuto, stabilnost pjene dobivena od proteina bjelanjaka može se okarakterizirati mjerenjem kapaciteta pjenjenja i drenažom uzorka (Yuceer i Caner, 2013).

Karakteristike pjenjenja ovise o korištenoj opremi i metodi tučenja i zato je poprilično teško komentirati i uspoređivati rezultate dobivene u različitim laboratorijima (Stadelman i Cotterill, 1995).

Utjecaj dodataka različitih koncentracija limunske kiseline na kapacitet pjenjenja cijelog pasteriziranog jajeta tijekom skladištenja od 4 tjedna prikazan je na slici 11.



Slika 11. Utjecaj različitih koncentracija limunske kiseline na kapacitet pjenjenja tijekom skladištenja

Kapacitet pjenjenja kontrolnog uzorka pasteuriziranog cijelog jajeta nakon tjedan dana skladištenja iznosio je 445 % dok se tijekom daljnjeg skladištenja rezultati kapaciteta smanjuju za 5,62 % pri vremenu skladištenja od 3 tjedna pa čak do 12,36 % pri dužini skladištenja od 4 tjedna.

Vrijednosti kapaciteta pjenjenja uzorka cijelog jaja u koji je dodano 300 mg L⁻¹ limunske kiseline ostao je konstantan tokom cijelog perioda skladištenja i kreće se od 400 – 410 %.

Nadalje, dodatak 400 mg L⁻¹ limunske kiseline u uzorak cijelog pasteuriziranog jajeta tijekom prva dva tjedna skladištenja pokazao se najboljim gledajući dobivene vrijednosti kapaciteta pjenjenja. Međutim, nakon 3 tjedna skladištenja, kapacitet pjenjenja iznosi 410 % što je pad za 9,89 % od vrijednosti kapaciteta određene unutar prvog tjedna. Nakon 4 tjedna skladištenja, kapacitet pjenjenja smanjuje se za čak 27,47 %, odnosno iznosi 330 %.

Isti trend kao i kod dodatka 400 mg L⁻¹ limunske kiseline pokazao se i dodatkom 500 mg L⁻¹ limunske kiseline gdje se sposobnost pjenjenja proteina jaja smanjuje obzirom na povećanje vremena skladištenja uzoraka. Tako se nakon 2 tjedna vrijednosti kapaciteta uzorka pasteuriziranog cijelog jaja s dodatkom 500 mg L⁻¹ limunske kiseline iznosi 375 % što predstavlja smanjenje za 14,77 %, a zadnjeg dana skladištenja iznosi 280 % što je čak 36,36 % manje u odnosu na vrijednost dobivenu nakon jednog dana skladištenja.

Prema dobivenim rezultatima može se vidjeti značajna promjena u sposobnosti pjenjenja proteina između kontrolnog uzorka i uzorka u koje su dodane određene koncentracije limunske kiseline nakon skladištenja od 4 tjedna, gdje se kao najefikasniji pokazao dodatak limunske kiseline u količini od 300 mg L⁻¹.

Statističkom obradom podataka, gdje su kao faktori uzeti udio limunske kiseline (mg L⁻¹) i tjedni skladištenja, pokazalo se kako su oba faktora, kao i njihova integracija, statistički signifikantni ($p < 0,05$) (tablica 7).

U tablici 7 i 8 prikazani su statistički obrađeni rezultati dobiveni određivanjem kapaciteta pjenjenja.

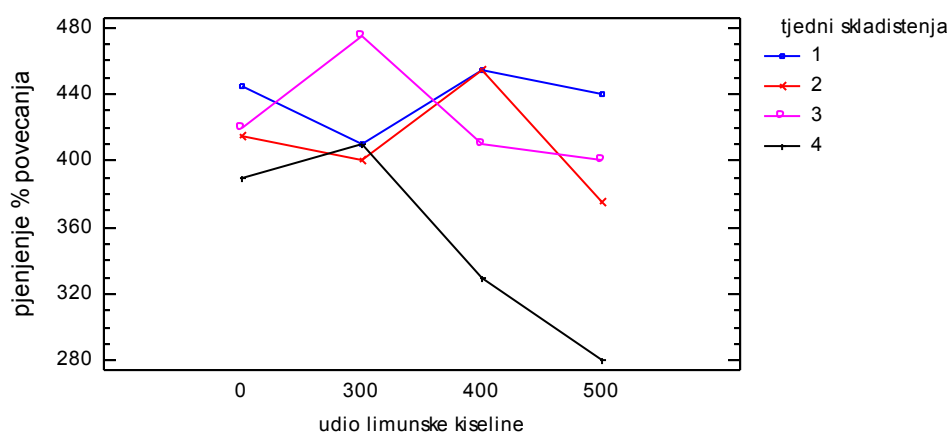
Tablica 7. Analiza varijance za kapacitet pjenjenja

Izvor	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednje odstupanje	F-veličina	p-vrijednost
A:udio limunske kiseline	26,24	3	8,75	23,67	0,000
B:tjedni skladištenja	57,01	3	19,00	51,44	0,000
Interakcija					
AB	36,57	9	4,06	11,00	0,000
Ukupna pogreška	5,91	16	0,37		
Ukupna korekcija	125,74	31			

Tablica 8. Prikaz metode najmanjih kvadrata za kapacitet pjenjenja s 95 % značajnosti

<i>Nivo</i>	<i>Broj</i>	<i>Srednja vrijednost</i>	<i>Standardna pogreška</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maksimum</i>
Ukupna srednja vrijednost	32	16,10			
udio limunske kiseline					
0	8	15,51	0,21	15,05	15,96
300	8	15,23	0,21	14,78	15,69
400	8	16,07	0,21	15,61	16,52
500	8	17,58	0,21	17,12	18,03
tjedni skladištenja					
1	8	15,22	0,21	14,76	15,67
2	8	15,50	0,21	15,05	15,96
3	8	15,27	0,21	14,81	15,72
4	8	18,40	0,21	17,95	18,86
udio limunske kiseline / tjedni skladištenja					
0,1	2	14,86	0,43	13,95	15,77
0,2	2	15,05	0,43	14,14	15,96
0,3	2	15,19	0,43	14,28	16,10
0,4	2	16,94	0,43	16,02	17,85
300,1	2	15,89	0,43	14,97	16,80
300,2	2	15,80	0,43	14,89	16,71
300,3	2	13,76	0,43	12,84	14,67
300,4	2	15,50	0,43	14,58	16,41
400,1	2	14,87	0,43	13,95	15,78
400,2	2	14,42	0,43	13,51	15,33
400,3	2	15,79	0,43	14,88	16,70
400,4	2	19,20	0,43	18,29	20,11
500,1	2	15,26	0,43	14,34	16,17
500,2	2	16,74	0,43	15,83	17,65
500,3	2	16,34	0,43	15,42	17,25
500,4	2	21,98	0,43	21,06	22,89

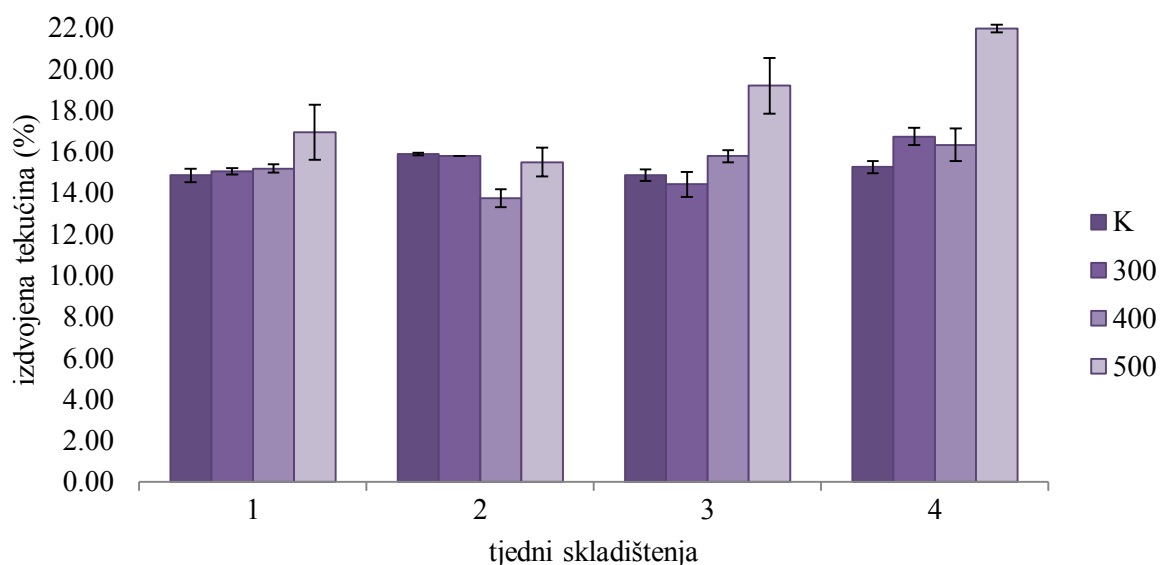
Na slici 12 prikazana je interakcija udjela limunske kiseline na kapacitet pjenjenja kroz tjedne skladištenja.



Slika 12. Prikaz interakcije udjelu limunske kiseline na kapacitet pjenjenja kroz tjedne skladištenja

Na slici 12 može se vidjeti kako je kapacitet pjenjenja bio najviši u 3. tjednu skladištenja kod uzorka s 300 mg L⁻¹, a najniži je bio kod uzorka s 500 mg L⁻¹ limunske kiseline u 4. tjednu skladištenja.

Na slici 13 prikazan je utjecaj različitih koncentracija limunske kiseline na postotak izdvojene tekućine.



Slika 13. Utjecaj različitih koncentracija limunske kiseline na % izdvojene tekućine tijekom skladištenja

Kontrolni uzorak cijelog jajeta pokazao je konstantni postotak izdvojene tekućine tijekom 4 tjedna skladištenja koji je iznosio 14,86 do 15,88 %. Isto tako, uzorci u koje je dodano 300 i 400 mg L⁻¹ limunske kiseline nisu bitno utjecala na održavanje stabilnosti pjene tijekom prva 3 tjedna skladištenja obzirom da su dobivene vrijednosti relativno konstantne. U zadnjih tjedan dana postotak izdvojene tekućine povećao za 6,61 – 8,84 % u odnosu na kontrolni uzorak.

Yuceer i Caner (2014) su u svojem istraživanju također potvrdili korelaciju između postotka izdvojene tekućine i vremena skladištenja uzoraka na stabilnost pjene koja se događa prvenstveno zbog smanjivanja debljine vanjskog proteinskog filma mjehurića pjene koji ruptira i dovodi do njenog kolapsa (Kinsella i Phillips, 1989; Liang i Kristinsoon, 2007). Do istog zaključka došli su i brojni drugi znanstvenici koji su usmjerili važnost na povezanost smanjenja količine proteina bjelanjaka koji formiraju tanki film mjehurića pjene sa starosti jaja (Lomakina i Mikova, 2006; Silversides i Budgell, 2004; Hammershoj i Qvisit, 2001; Roculli i sur, 2011).

Uzorak cijelog jajeta u koji je dodano 500 mg L⁻¹ limunske kiseline pokazao je najveću drenažu u odnosu na sve ispitivane uzorke i tijekom skladištenja se njene vrijednosti povećavaju za čak 22,89 % što indicira najslabiju stabilnost pjene.

Ovakav trend povećanja postotka izdvojene tekućine s povećanjem kiselosti uzorka potvrdili su i Hammershoj i Larsen (1999) koji su ustanovili da je postotak izdvojene tekućine obrnuto proporcionalan stabilnosti pjene i da je veći kod pH 4,8 nego kod pH 10,7. Također, Chang i Chen (2000) su u svojim radovima proučavali utjecaj različitih pH na promjenu stabilnosti pjene.

Kontrolni uzorak cijelog jajeta nakon 4 tjedna pokazao je najmanji postotak izdvojene tekućine što ukazuje na to da uzorak bez dodatka limunske kiseline i bez promjene pH ima najveću stabilnost pjene.

U tablici 9 i 10 prikazani su statistički obrađeni rezultati dobiveni određivanjem postotka izdvojene tekućine. Statističkom obradom podataka, gdje su kao faktori uzeti udio limunske kiseline (mg L^{-1}) i tjedni skladištenja, pokazalo se kako su oba faktora, kao i njihova interakcija, statistički signifikantni ($p < 0,05$) (tablica 9).

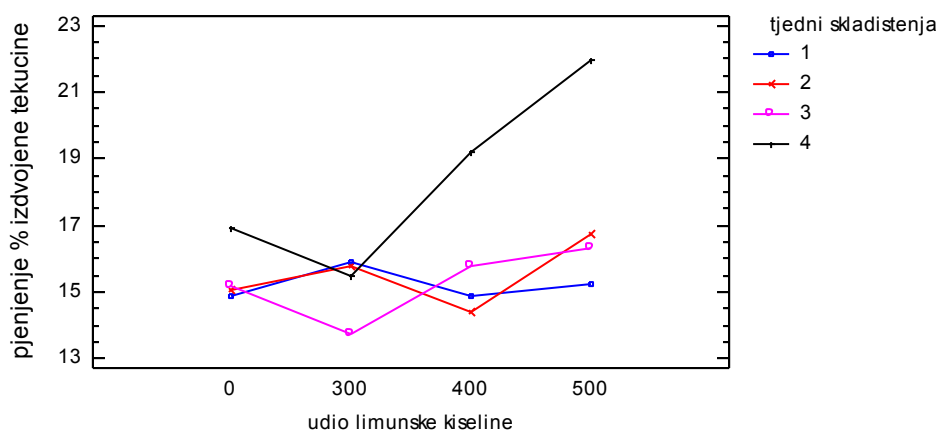
Tablica 9. Analiza varijance za postotak izdvojene tekućine

<i>Izvor</i>	<i>Suma kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednje odstupanje</i>	<i>F-veličina</i>	<i>p-vrijednost</i>
A:udio limunske kiseline	12212,50	3,00	4070,83	10,34	0,001
B:tjedni skladištenja	34312,50	3,00	11437,50	29,05	0,000
Interakcija					
AB	24462,50	9,00	2718,06	6,90	0,000
Ukupna pogreška	6300,00	16,00	393,75		
Ukupna korekcija	77287,50	31,00			

Tablica 10. Prikaz metode najmanjih kvadrata za postotak izdvojene tekućine s 95 % značajnosti

<i>Nivo</i>	<i>Broj</i>	<i>Srednja vrijednost</i>	<i>Standardna pogreška</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maksimum</i>
Ukupna srednja vrijednost	32	406,88			
udio limunske kiseline					
0	8	417,50	7,02	402,63	432,37
300	8	423,75	7,02	408,88	438,62
400	8	412,50	7,02	397,63	427,37
500	8	373,75	7,02	358,88	388,62
tjedni skladištenja					
1	8	437,50	7,02	422,63	452,37
2	8	411,25	7,02	396,38	426,12
3	8	426,25	7,02	411,38	441,12
4	8	352,50	7,02	337,63	367,37
udio limunske kiseline / tjedni skladištenja					
0,1	2	445,00	14,03	415,26	474,75
0,2	2	415,00	14,03	385,26	444,75
0,3	2	420,00	14,03	390,26	449,75
0,4	2	390,00	14,03	360,26	419,75
300,1	2	410,00	14,03	380,26	439,75
300,2	2	400,00	14,03	370,26	429,75
300,3	2	475,00	14,03	445,26	504,75
300,4	2	410,00	14,03	380,26	439,75
400,1	2	455,00	14,03	425,26	484,75
400,2	2	455,00	14,03	425,26	484,75
400,3	2	410,00	14,03	380,26	439,75
400,4	2	330,00	14,03	300,26	359,75
500,1	2	440,00	14,03	410,26	469,75
500,2	2	375,00	14,03	345,26	404,75
500,3	2	400,00	14,03	370,26	429,75
500,4	2	280,00	14,03	250,26	309,75

Na slici 14 prikazana je interakcija udjela limunske kiseline na postotak izdvojene tekućine.



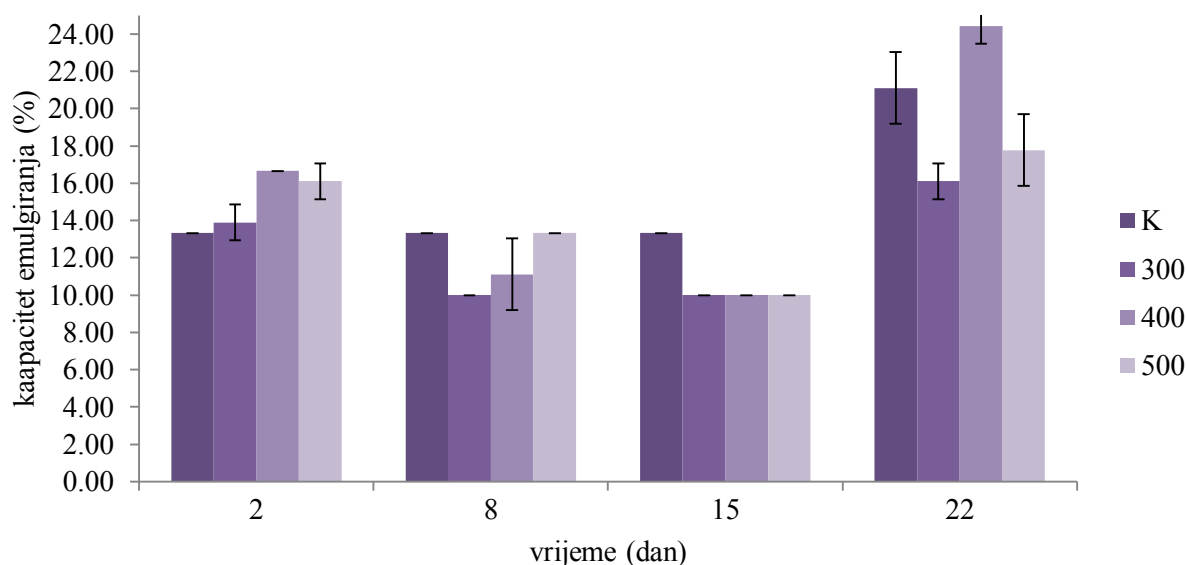
Slika 14. Prikaz interakcije udjela limunske kiseline na postotak izdvojene tekućine kroz tjedne skladištenja

Na slici 12 se može vidjeti kako je postotak izdvojene tekućine bio najmanji u 3. tjednu skladištenja kod uzorka s 300 mg L⁻¹ limunske kiseline, dok je najviši bio kod tekućih pasteriziranih jaja s 500 mg L⁻¹ limunske kiseline u 4. tjednu skladištenja.

4.4. ODREĐIVANJE EMULGIRAJUĆIH SVOJSTAVA

Prema Pearce i Kinsella (1978) kapacitet emulgiranja, odnosno indeks aktiviteta emulzije zapravo predstavlja površinu međufaze koju može stabilizirati jedan gram proteina. Stoga u proteinima stabiliziranim emulzijama, upravo proteini osiguravaju nastanak međufazne membrane oko masne globule čime se sprječava flokulacija, koalescencija i izdvajanje ulja odnosno doprinose povećanju stabilnosti emulzija. Smatra se da su upravo proteini velike molekulske mase ili oni djelomično denaturirani pa spojeni u agregate odgovorni za stabilizaciju masnih globula odnosno same emulzije (Jayaprakasha i Brueckner, 1999). Stabilnost emulzije uvelike ovisi i o pH vrijednost i ionskoj jakosti pripremljene emulzije (Hermansson, 1979).

Na slici 15 prikazan je utjecaj različitih koncentracija limunske kiseline na kapacitet emulgiranja tijekom 4 tjedna skladištenja.



Slika 15. Utjecaj različitih koncentracija limunske kiseline na kapacitet emulgiranja tijekom skladištenja

Ovisnost kapaciteta emulgiranja o pH vrijednosti potvrdili su rezultati istraživanja Mizutani i Nakamura (1984) koji ukazuju na najveću stabilnost emulzija pri pH vrijednostima od 6 do 8,5, dok se one smanjuju daljnjim zakiseljavanjem ili obrnuto. Isto su zaključili i Anton

i Gandemer (1999) čije je istraživanje pokazalo kako proteini jaja bolje apsorbiraju u membranu masne globule pri pH vrijednostima bliskim neutralnom pH.

Statistički najznačajniji kapacitet emulgiranja pokazao je uzorak skladišten 4 tjedna u kojeg je dodano 400 mg L⁻¹ limunske kiseline, a vrijednost kapaciteta emulgiranja iznosi 24,44 %. U usporedbi sa rezultatima kapaciteta dobivenim nakon tjedan dana skladištenja, kapacitet takvog uzorka veći je za 7,77 %. Isti trend porasta kapaciteta emulgiranja sa 13,33 % na 21,11 % bilježi uzorak pasteuriziranog jaja u koji nije dodana kiselina.

S druge strane, uzorci u koje su dodane 300 i 400 mg L⁻¹ limunske kiseline nisu pokazali značajni utjecaj na poboljšanje kapaciteta emulgiranja tokom bilo koje starosti, odnosno neovisno o duljini skladištenja jer su se rezultati kapaciteta uzoraka u koje je dodano 300 mg L⁻¹ limunske kiseline nakon tjedan dana sposobnost emulgiranja s 13,89 % promijenili na tek 16,11 %.

U tablici 11 i 12 prikazani su statistički obrađeni rezultati dobiveni određivanjem postotka izdvojene tekućine. Statističkom obradom podataka, gdje su kao faktori uzeti udio limunske kiseline (mg L⁻¹) i tjedni skladištenja, pokazalo se kako su oba faktora, kao i njihova interakcija, statistički signifikantni ($p < 0,05$) (tablica 11).

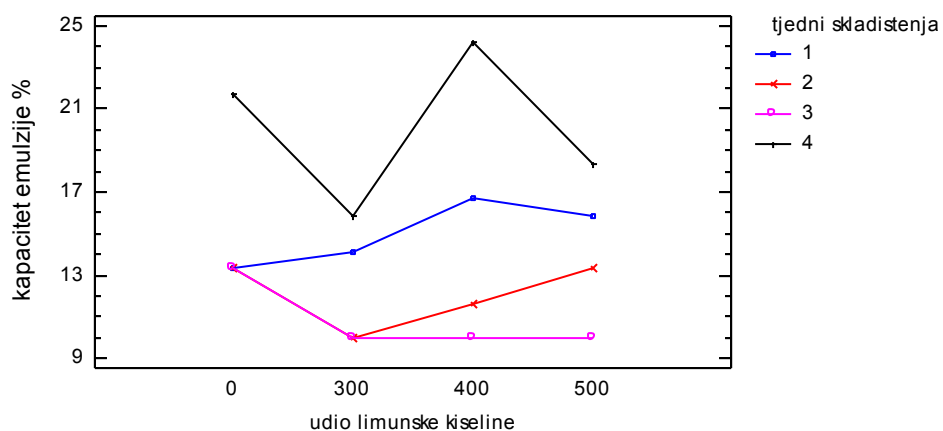
Tablica 11. Analiza varijance za kapacitet emulgiranja

<i>Izvor</i>	<i>Suma kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednje odstupanje</i>	<i>F-veličina</i>	<i>p-vrijednost</i>
A:udio limunske kiseline	48,91	3	16,30	11,75	0,000
B:tjedni skladištenja	398,39	3	132,80	95,66	0,000
Interakcija					
AB	77,39	9	8,60	6,19	0,001
Ukupna pogreška	22,21	16	1,39		
Ukupna korekcija	546,91	31			

Tablica 12. Prikaz metode najmanjih kvadrata za kapacitet emulgiranja s 95 % značajnosti

<i>Nivo</i>	<i>Broj</i>	<i>Srednja vrijednost</i>	<i>Standardna pogreška</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maksimum</i>
Ukupna srednja vrijednost	32	14,48			
udio limunske kiseline					
0	8	15,41	0,42	14,53	16,30
300	8	12,50	0,42	11,62	13,38
400	8	15,63	0,42	14,74	16,51
500	8	14,38	0,42	13,49	15,26
tjedni skladištenja					
1	8	15,00	0,42	14,12	15,88
2	8	12,08	0,42	11,20	12,96
3	8	10,83	0,42	9,95	11,72
4	8	20,00	0,42	19,12	20,88
udio limunske kiseline / tjedni skladištenja					
0,1	2	13,33	0,83	11,56	15,10
0,2	2	13,33	0,83	11,56	15,10
0,3	2	13,33	0,83	11,56	15,10
0,4	2	21,67	0,83	19,90	23,43
300,1	2	14,17	0,83	12,40	15,93
300,2	2	10,00	0,83	8,23	11,77
300,3	2	10,00	0,83	8,23	11,77
300,4	2	15,84	0,83	14,07	17,60
400,1	2	16,67	0,83	14,90	18,44
400,2	2	11,67	0,83	9,90	13,43
400,3	2	10,00	0,83	8,23	11,77
400,4	2	24,17	0,83	22,40	25,93
500,1	2	15,84	0,83	14,07	17,60
500,2	2	13,33	0,83	11,56	15,10
500,3	2	10,00	0,83	8,23	11,77
500,4	2	18,34	0,83	16,57	20,10

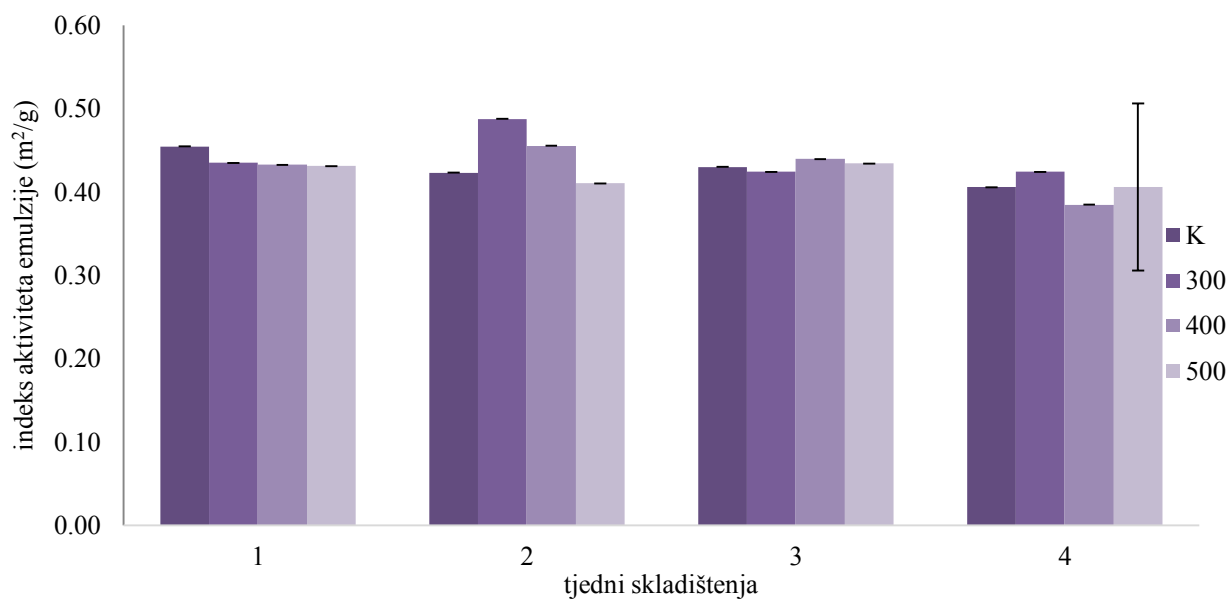
Na slici 16 prikazana je interakcija udjela limunske kiseline na kapacitet emulgiranja kroz 4 tjedna skladištenja.



Slika 16. Prikaz interakcije udjelu limunske kiseline na kapacitet emulgiranja kroz tjedne skladištenja

Na slici 17 se vidi kako je kapacitet emulgiranja bio najveći kod uzorka s 400 mg L⁻¹ limunske kiseline tijekom 4. tjedna skladištenja, a najmanji u 3. tjednu skladištenja kod uzoraka s 300, 400 i 500 mg L⁻¹ limunske kiseline.

Na slici 17 prikazan je utjecaj različitih koncentracija limunske kiseline na indeks aktiviteta emulzije tijekom 4 tjedna skladištenja.



Slika 17. Utjecaj različitih koncentracija limunske kiseline na indeks aktiviteta emulzije tijekom skladištenja

Metodom po Webb i sur. (2002) određen je indeks aktiviteta emulzije. Usporedbom tih rezultata s onima dobivenim za kapacitet emulgiranja može se potvrditi korelacija između istih.

Statističkom obradom podataka, gdje su kao faktori uzeti udio limunske kiseline (mg L^{-1}) i tjedni skladištenja, pokazalo se kako su oba faktora, kao i njihova interakcija, statistički signifikantni ($p < 0,05$) (tablica 13).

U tablici 13 i 14 prikazani su statistički obrađeni rezultati dobiveni određivanjem postotka izdvojene tekućine.

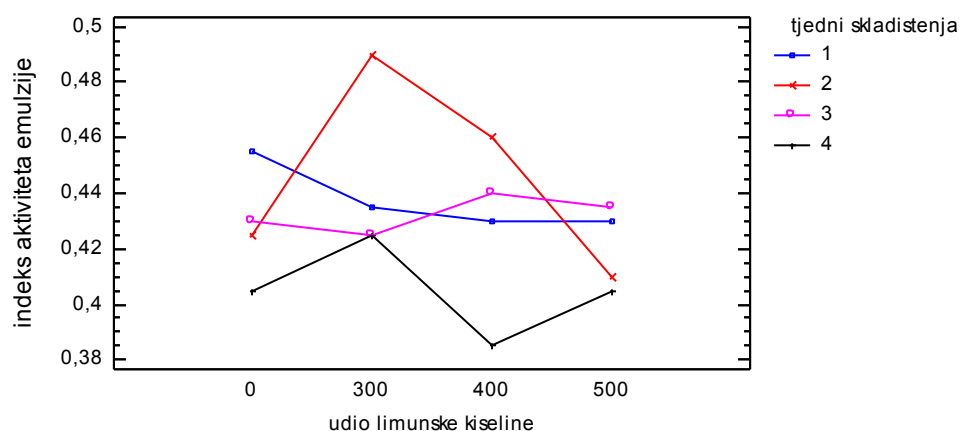
Tablica 13. Analiza varijance za indeks aktiviteta emulzije

<i>Izvor</i>	<i>Suma kvadrata</i>	<i>Stupnjevi slobode</i>	<i>Srednje odstupanje</i>	<i>F-veličina</i>	<i>p-vrijednost</i>
A:udio limunske kiseline	0,002334	3	0,000778	27,67	0,000
B:tjedni skladištenja	0,007609	3	0,002536	90,19	0,000
Interakcija					
AB	0,008103	9	0,000900	32,01	0,000
Ukupna pogreška	0,000450	16	0,000028		
Ukupna korekcija	0,018497	31			

Tablica 14. Prikaz metode najmanjih kvadrata za indeks aktiviteta emulzije s 95 % značajnosti

<i>Nivo</i>	<i>Broj</i>	<i>Srednja vrijednost</i>	<i>Standardna pogreška</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maksimum</i>
Ukupna srednja vrijednost	32	0,430			
udio limunske kiseline					
0	8	0,429	0,002	0,425	0,433
300	8	0,444	0,002	0,440	0,448
400	8	0,429	0,002	0,425	0,433
500	8	0,420	0,002	0,416	0,424
tjedni skladištenja					
1	8	0,438	0,002	0,434	0,441
2	8	0,446	0,002	0,442	0,450
3	8	0,433	0,002	0,429	0,436
4	8	0,405	0,002	0,401	0,409
udio limunske kiseline / tjedni skladištenja					
0,1	2	0,455	0,004	0,447	0,463
0,2	2	0,425	0,004	0,417	0,433
0,3	2	0,430	0,004	0,422	0,438
0,4	2	0,405	0,004	0,397	0,413
300,1	2	0,435	0,004	0,427	0,443
300,2	2	0,490	0,004	0,482	0,498
300,3	2	0,425	0,004	0,417	0,433
300,4	2	0,425	0,004	0,417	0,433
400,1	2	0,430	0,004	0,422	0,438
400,2	2	0,460	0,004	0,452	0,468
400,3	2	0,440	0,004	0,432	0,448
400,4	2	0,385	0,004	0,377	0,393
500,1	2	0,430	0,004	0,422	0,438
500,2	2	0,410	0,004	0,402	0,418
500,3	2	0,435	0,004	0,427	0,443
500,4	2	0,405	0,004	0,397	0,413

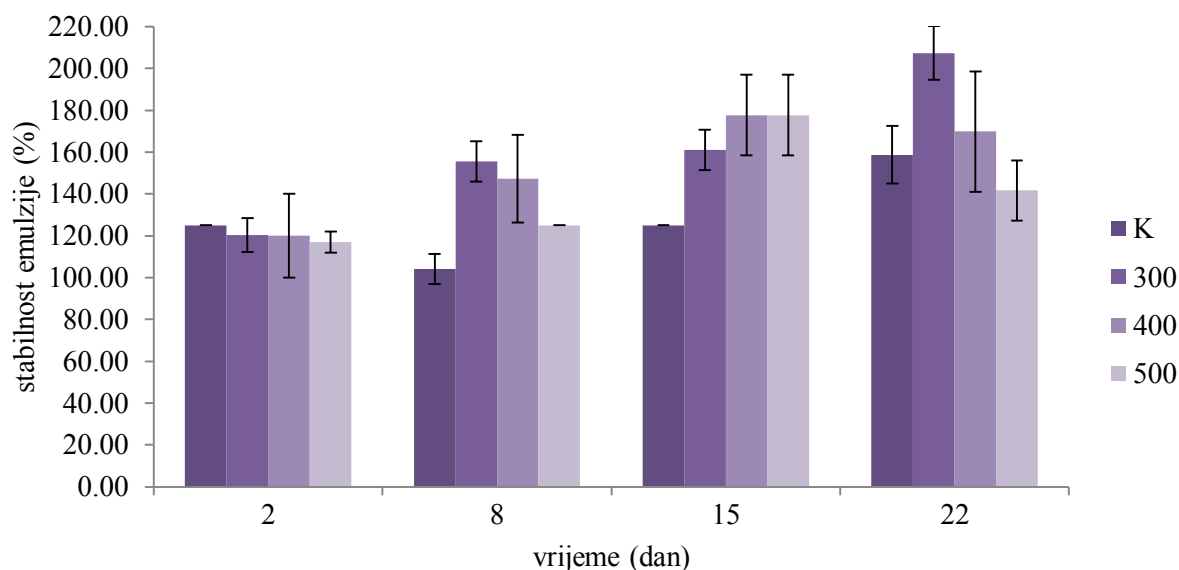
Na slici 18 prikazana je interakcija udjela limunske kiseline na indeks aktiviteta emulzije kroz 4 tjedna skladištenja.



Slika 18. Prikaz interakcije udjelu limunske kiseline na indeks aktiviteta emulzije kroz tjedne skladištenja

Na slici 18 vidi se kako je indeks aktiviteta emulzije bio najveći kod uzorka s 300 mg L⁻¹ limunske kiseline u 2. tjednu skladištenja, a najmanji u 4. tjednu skladištenja kod uzorka s 400 mg L⁻¹ limunske kiseline.

Na slici 19 prikazan je utjecaj različitih koncentracija limunske kiseline na stabilnost emulzije.



Slika 19. Utjecaj različitih koncentracija limunske kiseline na stabilnost emulzije tijekom skladištenja

Ako se promatra kontrolni uzorak i uzorak s 500 mg L^{-1} limunske kiseline, može se primijetiti kako je razlika u stabilnosti emulzije minimalna. Konkretno, stabilnost emulzije kontrolnog uzorka nakon 4 tjedna skladištenja porasla je za 21,25 %, dok je kod uzorka s 500 mg L^{-1} limunske kiseline taj porast iznosio svega 17,39 %.

Nešto veći porast vrijednosti za stabilnost emulzije bilježi uzorak u koji je dodano 400 mg L^{-1} limunske kiseline i to za 29,35 %. Najznačajniji rezultat ostvaruje uzorak s 300 mg L^{-1} limunske kiseline gdje stabilnost nakon 4 tjedna skladištenja je veći za 41,96 % u odnosu na isti uzorak nakon tjedan dana skladištenja.

Statističkom obradom podataka, gdje su kao faktori uzeti udio limunske kiseline (mg L^{-1}) i tjedni skladištenja, pokazalo se kako su oba faktora, kao i njihova interakcija, statistički signifikantni ($p < 0,05$) (tablica 15).

U tablici 15 i 16 prikazani su statistički obrađeni rezultati dobiveni određivanjem stabilnosti emulzije.

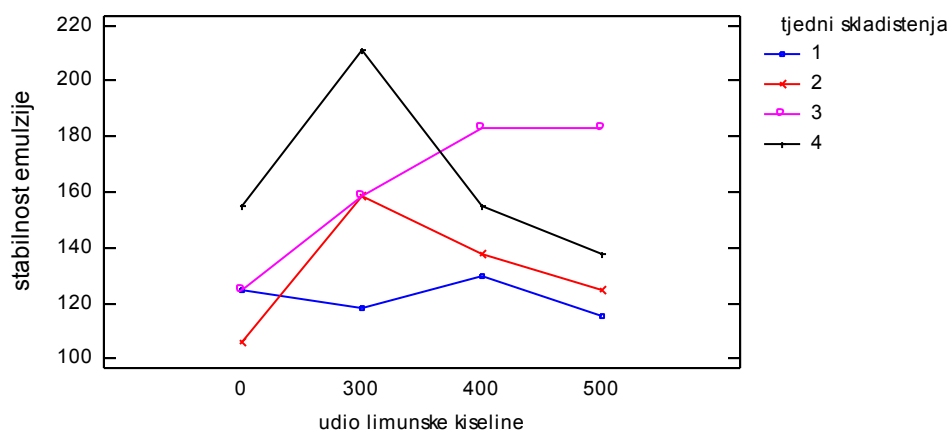
Tablica 15. Analiza varijance za stabilnost emulzije

Izvor	Suma kvadrata	Stupnjevi slobode	Srednje odstupanje	F-veličina	p-vrijednost
A:udio limunske kiseline	5045,59	3,00	1681,86	8,30	0,002
B:tjedni skladištenja	11077,50	3,00	3692,50	18,23	0,000
Interakcija					
AB	8851,33	9,00	983,48	4,85	0,003
Ukupna pogreška	3241,67	16,00	202,60		
Ukupna korekcija	28216,10	31,00			

Tablica 16. Prikaz metode najmanjih kvadrata za stabilnost emulzije s 95 % značajnosti

<i>Nivo</i>	<i>Broj</i>	<i>Srednja vrijednost</i>	<i>Standardna pogreška</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maksimum</i>
Ukupna srednja vrijednost	32	145,24			
udio limunske kiseline					
0	8	127,75	5,03	117,09	138,42
300	8	161,46	5,03	150,79	172,13
400	8	151,40	5,03	140,73	162,07
500	8	140,35	5,03	129,68	151,02
tjedni skladištenja					
1	8	122,15	5,03	111,48	132,82
2	8	131,77	5,03	121,10	142,44
3	8	162,50	5,03	151,83	173,17
4	8	164,54	5,03	153,87	175,20
udio limunske kiseline / tjedni skladištenja					
0,1	2	125,00	10,06	103,66	146,34
0,2	2	106,25	10,06	84,91	127,59
0,3	2	125,00	10,06	103,66	146,34
0,4	2	154,77	10,06	133,43	176,10
300,1	2	118,06	10,06	96,72	139,39
300,2	2	158,34	10,06	137,00	179,67
300,3	2	158,34	10,06	137,00	179,67
300,4	2	211,11	10,06	189,77	232,45
400,1	2	130,00	10,06	108,66	151,34
400,2	2	137,50	10,06	116,16	158,84
400,3	2	183,34	10,06	162,00	204,67
400,4	2	154,77	10,06	133,43	176,10
500,1	2	115,56	10,06	94,22	136,89
500,2	2	125,00	10,06	103,66	146,34
500,3	2	183,34	10,06	162,00	204,67
500,4	2	137,50	10,06	116,16	158,84

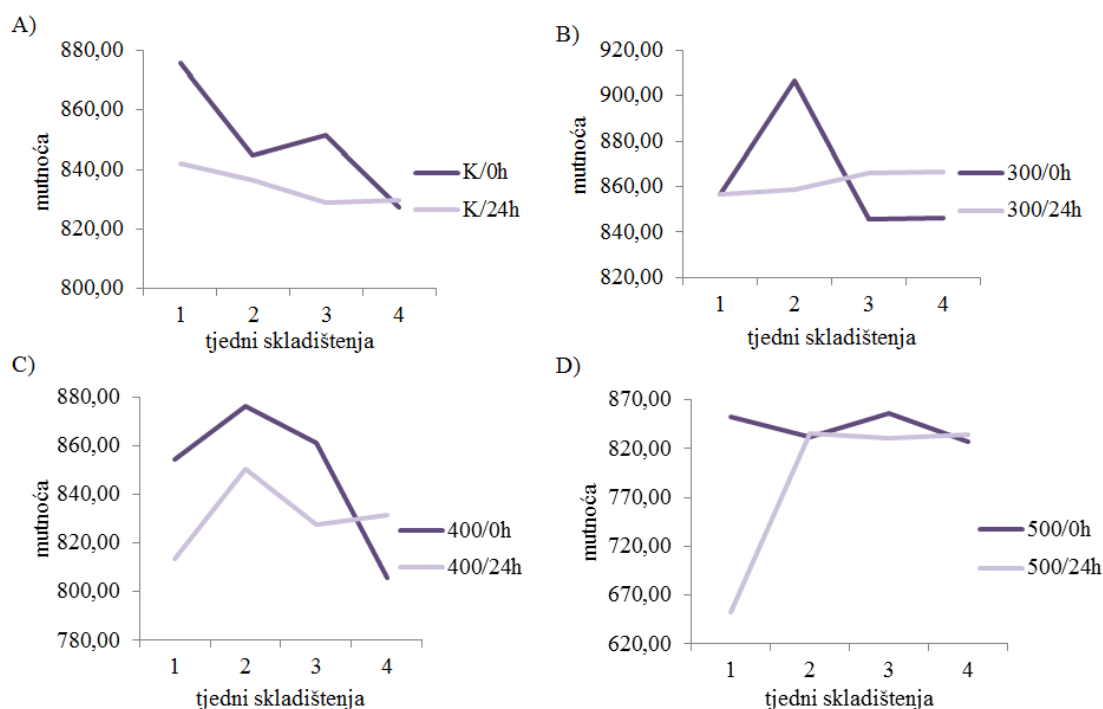
Na slici 20 prikazana je interakcija udjela limunske kiseline na stabilnost emulzije kroz 4 tjedna skladištenja



Slika 20. Prikaz interakcije udjela limunske kiseline na stabilnost emulzije kroz tjedne skladištenja

Na slici 20 može se vidjeti kako je emulzija bila najstabilnija u 4. tjednu kod uzorka s 300 mg L⁻¹ limunske kiseline, dok je najmanja vrijednost emulzije zabilježena u prvom tjednu u uzorku s 500 mg L⁻¹ limunske kiseline.

Utjecaj dodatak različitih koncentracija limunske kiseline prikazan je na slici 21.



Slika 21. Prikaz mutnoće pri 0 h i nakon 24 h za kontrolni uzorak (A) te za uzorke u koje je dodano 300 mg L⁻¹ (B), 400 mg L⁻¹ (C) i 500 mg L⁻¹ (D) limunske kiseline

Vrijednosti rezultata mutnoće ukazuju na to kako mutnoća kontrolnog uzorka postepeno pada s 857,50 na uzorcima skladištenim tjedan dana na vrijednost 827,24 nakon 4 tjedna skladištenja.

Mutnoća uzoraka u koje je dodana kiselina nakon tjedan dana skladištenja imaju vrijednosti kao i oni kontrolnog uzorka, no u usporedbi s istim pokazuju blaži pad mutnoće unutar prva tri tjedna skladištenja. Oni uzorci u koje je dodano 300 mg L⁻¹ limunske kiseline starosti iznad tri tjedna zadržavaju vrijednosti mutnoće vrlo bliske onima određenim na uzorcima nakon 24 h skladištenja. Vrijednost mutnoće određena na uzorcima starim 4 tjedna stoga su zadržani na vrlo niskoj vrijednosti od 846,12.

Dodatak kiseline u uzorke izaziva vrlo male promjene u mutnoći, bez obzira na starost jaja. S druge strane, uzorci s 400 mg L⁻¹ limunske kiseline uzrokuje pad mutnoće obzirom da ona pada na vrijednost 805,47.

Mutnoća nakon tjedan dana u uzorcima s 500 mg L⁻¹ limunske kiseline pokazuje manji pad ili čak porast uspoređujući s kontrolom koja pokazuje konstantan pad tijekom skladištenja.

Iz toga se može zaključiti kako dodatak kiseline, osobito u količinama od 300 i 500 mg L⁻¹, dobro djeluje na očuvanje mutnoće uzoraka.

Mutnoća uzoraka smanjuje se zbog intenzivnih procesa agregacije komponenata žumanjaka s proteinskim molekulama bjelanjaka (Lomakina i Mikova, 2006), zbog čega je mutnoća uzorka koji sadrži cijelo jaje veća nego ona koju bi sadržavao samo bjelanjak.

Cotteril i sur. (1959) proučavali su utjecaj pH vrijednosti na promjene u mutnoći uzorka i zaključili kako je mutnoća najmanja kod pH 9, dok se zakiseljavanjem povećava sve do pH 4 nakon čega opet pada.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka i provedene rasprave može se zaključiti sljedeće:

1. Najznačajniji rezultati redukcije broja bakterija dobiveni su upotrebom 500 mg L⁻¹ limunske kiseline.
2. Dodatak limunske kiseline utjecao je na topljivost proteina te je uzorak pasteriziranih cijelih jaja s 300 mg L⁻¹ limunske kiseline imao najveću topljivost proteina.
3. Na kapacitet pjenjenja utjecao je dodatak limunske kiseline i najveći kapacitet pjenjenja pokazao je uzorak pasteriziranih cijelih jaja s dodatkom 300 mg L⁻¹ limunske kiseline.
4. Dodatak limunske kiseline ima utjecaja na postotak izdvojene tekućine te najveći rezultat je dobiven s uzorkom tekućeg cijelog jajeta u koji je dodano 500 mg L⁻¹ limunske kiseline i on je bio najmanje stabilan.
5. Na kapacitet emulgiranja imao je utjecaja dodatak limunske kiseline, a najveći kapacitet emulgiranja imao je uzorak tekućih pasteriziranih jaja s 400 mg L⁻¹ limunske kiseline.
6. Dodatak limunske kiseline utjecao je na stabilnost emulzije i ona je bila najveća kod uzorka tekućih pasteriziranih jaja u koji je dodano 300 mg L⁻¹ limunske kiseline.
7. Na indeks aktiviteta emulzije utjecao je dodatak limunske kiseline i najbolji rezultat dao je uzorak pasteriziranih jaja s 300 mg L⁻¹ limunske kiseline.
8. Dodatak kiseline u količinama od 300 i 500 mg L⁻¹ djeluje pozitivno na očuvanje mutnoće uzoraka tekućih pasteriziranih jaja.
9. Bez obzira što je najveća redukcija broja bakterija dobivena upotrebom 500 mg L⁻¹ limunske kiseline, korištenjem te količine kiseline dolazi do značajnog narušavanja određivanih funkcionalnih svojstava. Upravo radi toga, najefikasnijim se smatra dodatak 300 mg L⁻¹ limunske kiseline tekućim pasteriziranim jajima.

6. LITERATURA

Alleoni, A. C. C. (2006) Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Scientia Agricola*. **63**, 291 – 298.

Anonymous (2005) EuroFIR - European Food Information Resource Network, Food composition databases, <<http://www.eurofir.org/food-information/food-composition-databases-2/>> . Pristupljeno 02.08.2016.

Anonymous (2011) E - brojevi, < <http://e-brojevi.udd.hr/> >. Pristupljeno 20.svibnja 2016.

Anonymous (2016) Food additives. <https://webgate.ec.europa.eu/sanco_foods/main/?sector=FAD> . Pristupljeno 14.8.2016.

Anton, M., Gandemer, G. (1999) Effect of pH on interface composition and on quality of oil-in-water emulsions made with hen egg yolk. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces* **12**, 351–358.

Assis, T.F., Garci Rojas, E.E., Souza, C. J. F., Giraldo – Zuniga, A.D., Melo, N.R. (2010) Solubility of egg yolk proteins: modelling and thermodynamic parameters. *Eur. Food Res. Technol.*, Springer Verlag, Brazil.

Bean, L. D., Leeson, S. (2003) Long – term effects of the feeding flaxseed on performance and egg fatty acid composition of brown and white hens. *Poultry Sci.* **82**, 388 – 394.

Bisperink, C. G. J., Ronteltap, A. D., Prins, A. (1992) Bubble – size distributions in foams. *Adv. Colloid Interface Sci.* **38**, 13 – 32.

Bolontrade, A.J., Scilingo, A.A., Añón, M.C. (2013) Amaranth Proteins Foaming Properties: Adsorption Kinetics and Foam formation – Part 1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. **105**, str. 319–327.

Bunchasak, C., Kachana, S. (2009) Dietary folate and vitamin B12 supplementation and consequent vitamin deposition in chicken eggs. *Trop. Anim. Health Prod.* **41**, 1583 – 1589.

Chang, Y. I., T. C. Chen. (2000) Functional and gel characteristics of liquid whole egg as affected by pH alteration. *J. Food Eng.* **45**, 237–241.

Chung, H., Rasmussen, H., Johnson, E. (2004) Lutein bioavailability is higher from lutein – enriched eggs than from supplements and spinach in men. *J. Nutr.* **134**, 1887 – 1893.

Clarkson, J. R., Cui, Z. F., Darton, R. C. (1999) Protein denaturation in foam. *J. Colloid Interf. Sci.* **215**, 323-332.

Cotterill, O.J., Gardner, F.A., Cunningham, F.E., Funk E.M. (1959) Titration curves and turbidity of whole egg white. *Poultry Sci.* **39**, 836.

Dairy and Egg Products, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22 (2009), Egg, yolk, raw, fresh, NDB No. 01125.

Dairy and Egg Products, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22 (2009), Egg, white, raw, fresh, NDB No. 01124.

Davis C. and Reeves R. (2002) High value opportunities from the chicken egg. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC Publication, 02 / 094.

EC (2008) Commission Directive 2008/100/EC amending Council Directive 90/496/EEC on nutrition labelling for foodstuffs as regards recommended daily allowances, energy conversion factors and definitions, *OJ. L285*, 28.10.2008.

Elmadfa, I. (2009) European nutrition and health report II. *Karger*. **62**, Basel.

Gaonkar, G., Koka, R., Chen, K., Campbell, B. (2010) Emulsifying functionality of enzyme-modified milk proteins in O/W and mayonnaise-like emulsions. *African Journal of Food Science*. **4**, 16 - 25.

HAH (2009) HAH - Hrvatska agencija za hranu, <<http://www.hah.hr/pdf/aditivi.pdf>>. Pristupljeno 23.08.2014.

Hallberg, L., Hulthen, L. (2000) Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**, 347 – 356.

Hammershøj, M., Larsen L.B. (1999) Foaming of ovalbumin and egg albumen fractions and the role of the disulfide bonds at various pH levels. U: Proceeding of VII European Symposium on the Quality of Eggs and Egg Products (Cavalchini, G.C., Baroli D., ured.), Bologna, str. 351–357.

Hammershøj, M., Qvist, K.B. (2001) Importance of hen age and egg storage time for egg albumen foaming. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* **34**, str. 118–120.

Herceg, Z., Režek, A. (2006) Prehrambena i funkcionalna svojstva koncentrata i izolata proteina sirutke. *Mljekarstvo* **56**, 379-396.

Hermansson, A. M. (1979) Aggregation and denaturation involved in gel formation. U: *Functionality and Protein Structure*. (Pour, E.A., ured.) American Chemical Society, Washington, str. 81-103.

Herron, K.L., Vega – Lopez, S., Conde, K., Ramjiganesh, T., Shachter, N.S., Fernandez, M.L. (2003) Men classified as hypo- or hyper-responders to dietary cholesterol feeding exhibit differences in lipoprotein metabolism, *J. Nutr.* **133** (4), 1036-1042.

HRN EN ISO 4833:2008 Jaja i proizvodi od jaja – Određivanje broja mikroorganizama (osnovna referentna metoda).

Jayaprakasha, H. M., Brueckner, H. (1999) Whey protein concentrate: a potential functional ingredient for food industry. *J. Food Sci. Tech.* **36**, 189-204.

Jeroch, H., Eder, K., Hirche, F., Böttcher, W., Sesekeviciene, J., Kluge, H. (2002) Amounts of essential fatty acids, α – tocopherol, folic acid, selenium and iodine in designer eggs. *International Symposium on Physiology of Livestock*, Lithuanian Veterinary Academy, str. 31 – 32.

Kinsella, J.E., Phillips, L.G. (1989) Structure function relationships in food proteins: films and foaming behavior. U: *Food Proteins* (Kinsella, J.E., Sounie, W.G., ured.) AOCS, Champaign, str. 52–77.

Kniewald, Z. (1993) Vitamini i hormoni: proizvodnja i primjena, *Hrvatska sveučilišna naklada*, Zagreb.

Kobayashi, T., Kato, I., Ohmiya, K., Shimizu, S. (1980) Recovery of foam stability of yolk – contaminated egg white by immobilized lipase. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 413 – 418.

Kretzschmar – McCluskey, V. K. (2007) Microbial analysis of shelled eggs and chemical and functional analysis of liquid eggs. Auburn University, Alabama.

Lechevalier, V., Croguennec T., Pezenec, S., Guerin – Dubiard, C., Pasco, M. i Nau, F. (2003) Ovalbumin, ovotransferrin, lysozyme: Three model proteins for structural modifications at the air – water interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 6354 – 6361.

- Lewis, N. M., Seburg, S., Flanagan, N. L (2000) Enriched eggs as a source of n – 3 polyunsaturated fatty acids for humans. *Poultry Sci.* **79**, 971 – 974.
- Liang, Y., Kristinsson, H.G. (2005) The influence of pH induced unfolding and refolding of egg albumen on its foaming properties. *J. Food Sci.* **70**, 222–230.
- Lomakina, K., Mikova, K. (2006) A study of the factors affecting the foaming properties of egg white – A review. *Czech Journal of Food Sciences.* **24** (3), 110 – 118.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Lewis Farr, A. i Randall R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 – 275.
- Lukač d.o.o. (2010) Interni dokument.
- Mattila, P., Rokka, T., Könkö, K., Valaja, J., Rossow, L. i Ryhänen, E. L. (2003) Effect of cholecalciferol – enriched hen feed on egg quality. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 283 – 287.
- Mine, Y. (1995) Recent advances in the understanding of egg – white protein functionality. *Trends in Food Science & Technology* **6**(7), 225 – 232.
- Mine, Y., Shahidi, F. (2006) Nutraceutical proteins and peptides in health and disease. *CRC / Tayloe and Francis*, Boca Raton.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva, ruralnog razvoja (2011) Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. 3.izd., Zagreb.
- Misutani, R., Nakamura, R. (1984) Emulsifying properties of egg yolk low-density lipoprotein (LDL): Comparison with bovine serum albumin and egg lecithin. *Food Sci. Technol.* **17**, 213.
- Nemanič, J., Berič, Ž. (1995) Peradarstvo, 1.izd., *Nakladni zavod Globus*, Zagreb, 137 – 140.
- Nys, Y., Sauveur, B. (2004) Valeur nutritionnelle des oeufs, *INRA Prod. Anim.* **17**(5), 385 – 393.
- Pariza, M. W. (2004) Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, str. 1132 – 1136.

- Pearce, K. N., Kinsella, J. E. (1978) Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidometric technique. *J. Agric. Food Chem.* **26**, 716-723.
- Rehault, S., Anton, M., Nau, F., Gautron, J., Nys, Y. (2007) Les activités biologiques de l'œuf, *INRA Prod. Anim.* **20** (4), 337 – 348.
- Režek Jambrak, A. (2008) Utjecaj ultrazvuka na fizikalna i funkcionalna svojstva proteina sirutke. Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb, str. 36 – 44.
- Rocculi, P., Cocci, E., Sirri, F., Cevoli, C., Romani, S., Dalla Rosa, M. (2011) Modified atmosphere packaging of hen table eggs: Effects on functional properties of albumen, *Poultry Sci.* **90**, 1791–1798.
- Silversides, F.G., Budgell, K. (2004) The relationships among measures of egg albumen height, pH and whipping volume. *Poultry Sci.* **83**, 1619–1623.
- Söderberg, J. (2013) Functional properties of legume proteins compared to egg proteins and their potential as egg replacers in vegan food. *Sveriges Lantbruksuniversitet*, **378**.
- Vaclavik, V., Christian, E. (2003) Essentials of Food Science. 2.izd., *Springer Science + Business Media*, New York.
- Vojdani, F. (1996) Solubility. U: Method of testing protein functionality (Hall, G. M, ured.), *Blackie Academic & Professional*, London.
- Wang, H., Tu, Z. C. (2008) Egg white protein dynamic modification of ultrahigh-pressure micro jet and mechanism, Nanchang University.
- Webb, M.F., Maaem, H.A., Schmidt, K.A. (2002) Food protein functionality in a liquid syste. *Journal of Food Science* **67**, 2896 – 2902.
- Yadav, N. K., Vadehra, D. V. (1977) Mechanism of egg white resistance to bacterial growth. *Journal of Food Science* **42**, 97 – 99.
- Yang, R. X., Li, W. Z., Zhu, C. Q., Zhang, Q. (2009) Effects of ultra-high hydrostatic pressure on foaming and physical-chemistry properties of egg white. *J. Biomed. Sci. Eng.* **2**, 617-620.

Yang, S.C., Baldwin, R. E. (1995) Functional Properties of Eggs in Foods. U: Science and Tchnology (Stadelman, W. J., Newkirk, D. i Newby, L., ured.), 4.izd, *The Hogwarth Press, Inc.*, New York, str. 405 – 465.

Young, L. L., Lyon, C. E. (1997) Effect of postchill aging and sodium tripolyphosphate on moisture binding properties, color, and Warner-Bratzler shear values of chicken breast meat. *Poult. Sci.* **76**, 1587–1590.

Yuceer, M., Caner, C. (2013) Antimicrobial lysozyme–chitosan coatings affect functional properties and shelf life of chicken eggs during storage, doi: 10.1002/jsfa.6322